

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA

E.A.P. DE MEDICINA VETERINARIA

Respuesta inmune en conejos a dos tamaños de
Sarcocystis aucheniae

TESIS

para optar el título profesional de Médico Veterinario

AUTOR:

Jaime Romero Jurado

Lima-Perú

2009

INDICE

| | |
|---|------------|
| LISTAS DE CUADROS | i |
| LISTA DE FIGURAS | ii |
| RESUMEN | iii |
| SUMARY | iv |
| I. INTRODUCCION | 1 |
| II. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA | 3 |
| 2.1 SARCOCYSTIOSIS | 3 |
| 2.2 ESPECIES DE SARCOCYSTIS | 4 |
| 2.3 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DEL PARASITO | 7 |
| 2.3.1 Ooquiste | 7 |
| 2.3.2 Quiste | 8 |
| 2.4 CICLO BIOLOGICO | 9 |
| 2.5 PATOGENIA Y SIGNOS CLINICOS | 11 |
| 2.5.1 Hospedero definitivo | 11 |
| 2.5.2 Hospedero intermediario | 13 |
| 2.6 EPIDEMIOLOGIA | 19 |
| 2.6.1 Transmisión | 20 |
| 2.6.2 Factores de riesgo | 20 |
| 2.6.2.1 Clima | 20 |
| 2.6.2.2 Edad de los animales | 21 |
| 2.6.2.3 El sistema de manejo | 21 |
| 2.7 INMINOLOGIA | 22 |
| 2.7.1 Estructura antigénica. | 22 |
| 2.7.1.1 Respuesta Inmune humoral | 24 |
| 2.7.1.2 Respuesta inmune celular | 25 |
| 2.8 PERDIDAS ECONÓMICAS | 26 |
| 2.9 IMPORTANCIA EN SALUD PUBLICA | 27 |
| 2.10 DIAGNOSTICO | 28 |
| 2.10.1 Hospedero definitivo | 28 |
| 2.10.2 Hospedero intermediario | 28 |
| 2.10.2.1 Técnicas Serológicas | 29 |
| 2.10.2.1.1 Prueba de Aglutinación | 29 |
| Indirecta | |

| | | |
|-------------|--|-----------|
| 2.10.2.1.2 | Inmunodifusión Doble | 29 |
| 2.10.2.1.3 | Prueba de ELISA | 30 |
| 2.10.2.1.4 | Prueba de Inmunofluorescencia (IFI) | 31 |
| 2.10.2.1.5 | Prueba de Western Blot. | 32 |
| 2.10.2.1.6 | Reacción en cadena Polimerasa (PCR) | 33 |
| 2.11 | PREVENCION Y CONTROL | 34 |
| 2.12 | TRATAMIENTO | 36 |
| III. | MATERIALES Y MÉTODOS | 39 |
| 3.1 | LUGAR DE ESTUDIO | 39 |
| 3.2 | MATERIAL DE ESTUDIO | 39 |
| 3.3 | DISTRIBUCION DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO | 40 |
| 3.4 | TAMAÑO MUESTRAL | 40 |
| 3.5 | PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL | 40 |
| 3.5.1 | Obtención del antígeno proteico crudo y preparación de los inóculos | 40 |
| 3.5.1.1 | Obtención de los macroquistes | 40 |
| 3.5.1.2 | Medición de proteínas mediante el método de Biuret | 44 |
| 3.5.1.3 | Prueba de esterilidad | 45 |
| 3.5.2 | Utilización de formaldehído, tratamiento térmico para la Inactivación del antígeno de <i>sarcocystis aucheniae</i> . | 46 |
| 3.6 | PREPARACION DEL INOCULO, INACTIVADO CON FORMOL Y MANEJO PARA LOS PROTOCOLOS DE TIEMPO DE DURACION DE 2 MESES Y 1 MES DE DURACION. | 46 |
| 3.7 | PREPARACION DEL INOCULO, INACTIVADO CON TRATAMIENTO TERMICO PARA PROTOCOLO DE 2 MESES DE DURACION. | 47 |
| 3.8 | MANEJO DE PROTOCOLOS DE INOCULACION | 47 |

| | | |
|-------|--|----|
| 3.9 | ÓBTENCION DE SUERO | 50 |
| 3.10 | DETECCION DE ANTICUERPOS Y TÉCNICAS USADAS | 50 |
| 3.11 | ANALISIS ESTADISTICO | 51 |
| IV. | RESULTADOS | 53 |
| V. | DISCUSION | 56 |
| VI. | CONCLUSIONES | 61 |
| VII. | RECOMENDACIONES | 62 |
| VIII. | BILBLIOGRAFIA | 63 |

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la respuesta inmune en conejos de macroquistes grandes y pequeños de *S. aucheniae*; utilizando tres protocolos de inoculación. Muestra de carne de alpaca con sarcocistiosis fueron remitidas del camal de Huancavelica al Laboratorio de Parasitología Veterinaria, donde se recolectaron y clasificaron según el tamaño, en macroquistes grandes (>5 mm.) y pequeños (1-3 mm), obteniéndose proteínas antigénicas de cada grupo, cuyas concentraciones proteicas fueron de 3,229 mg/ml y 2,2445 mg/ml respectivamente, obtenidas mediante el método de Biuret. Se inmunizaron dos grupos de 15 conejos c/u con proteína antigénica obtenida tanto de macroquistes “grandes” y “pequeños” de *S. aucheniae* y cada grupo fue dividido en 3 subgrupos de 5 conejos c/u.; a los cuales se les aplicó protocolos de inoculación (I y II) DE 1 Y 2 meses de duración respectivamente, con proteínas antigénicas inactivadas con formol y otro protocolo (III), con proteína antigénica inactivada con calor de 2 meses de duración. Posteriormente, se obtuvieron sueros detectándose la presencia de respuesta específica entre Ag y Ac en los dos tipos de macroquistes mediante la prueba de inmunodifusión y Ac en los dos tipos de macroquistes mediante la prueba de inmunodifusión doble de agar gel (AGID). La respuesta inmune obtenida con macroquistes grandes mostró un 100% de respuesta con los protocolos I y II y un 60% con el protocolo III. Con Respecto a los macroquistes pequeños se encontró un 100%, 60% y 40% de respuesta específica Ag y Ac con los protocolos de inoculación I, II y III respectivamente. En conclusión los extractos de proteínas antigénicas provenientes de macroquistes grandes de *S. aucheniae* presentaron una mayor respuesta inmune (86.6%) que con macroquistes pequeños (66.6%); al usar tres protocolos de inmunización. Sin embargo, al análisis de Fisher, no se observó asociación entre protocolos y reacción Ag – Ac.

Palabras Clave: *Sarcocystis aucheniae*, macroquistes, proteínas antigénicas, respuesta inmune, protocolos de inoculación

LISTA DE CUADROS

| | Pág. |
|---|-------------|
| Cuadro 1. Mecanismo patogénico de la Sarcocistiosis. | 19 |
| Cuadro 2. Respuesta específica Ag-Ac en quistes grandes (> 5mm) de <i>Sarcocystis aucheniae</i> mediante Inmunodifusión. FMV-UNMSM 2008 | 54 |
| Cuadro 3. Respuesta específica Ag-Ac en quistes pequeños (1-3mm) de <i>Sarcocystis aucheniae</i> mediante Inmunodifusión. FMV-UNMSM 2008 | 54 |
| Cuadro 4. Respuesta específica Ag-Ac en macroquistes grandes (>5mm) y pequeños (1-3mm) de <i>Sarcocystis aucheniae</i> mediante Inmunodifusión empleando tres tipos de protocolo de inmunización. FMV-UNMSM 2008. | 55 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|-------------|
| FIGURA 1. Carne de alpaca infestada con macroquistes de <i>Sarcocystis aucheniae</i> . | 42 |
| FIGURA 2. Recolección de macroquistes. | 42 |
| FIGURA 3. Lavado de los macroquistes con PBS y antibiótico. | 43 |
| FIGURA 4. Clasificación de los macroquistes | 43 |

RESUMEN

El objetivo del estudio fue evaluar la respuesta inmune en conejos de macroquistes grandes y pequeños de *S. aucheniae*; utilizando tres protocolos de inoculación. Muestra de carne de alpaca con sarcocistiosis fueron remitidas del camal de Huancavelica al Laboratorio de Parasitología Veterinaria, donde se recolectaron y clasificaron según el tamaño, en macroquistes grandes (>5 mm.) y pequeños (1-3 mm), obteniéndose proteínas antigénicas de cada grupo, cuyas concentraciones proteicas fueron de 3,229 mg/ml y 2,2445 mg/ml respectivamente, obtenidas mediante el método de Biuret. Se inmunizaron dos grupos de 15 conejos c/u con proteína antigénica obtenida tanto de macroquistes “grandes” y “pequeños” de *S. aucheniae* y cada grupo fue dividido en 3 subgrupos de 5 conejos c/u.; a los cuales se les aplicó protocolos de inoculación (I y II) DE 1 Y 2 meses de duración respectivamente, con proteínas antigénicas inactivadas con formol y otro protocolo (III), con proteína antigénica inactivada con calor de 2 meses de duración. Posteriormente, se obtuvieron sueros detectándose la presencia de respuesta específica entre Ag y Ac en los dos tipos de macroquistes mediante la prueba de inmunodifusión y Ac en los dos tipos de macroquistes mediante la prueba de inmunodifusión doble de agar gel (AGID). La respuesta inmune obtenida con macroquistes grandes mostró un 100% de respuesta con los protocolos I y II y un 60% con el protocolo II. Con Respecto a los macroquistes pequeños se encontró un 100%, 60% y 40% de respuesta específica Ag y Ac con los protocolos de inoculación I, II y III respectivamente. En conclusión los extractos de proteínas antigénicas provenientes de macroquistes grandes de *S. aucheniae* presentaron una mayor respuesta inmune (86.6%) que con macroquistes pequeños (66.6%); al usar tres protocolos de inmunización. Sin embargo, al análisis de Fisher, no se observó asociación entre protocolos y reacción Ag – Ac.

Palabras Clave: *Sarcocystis aucheniae*, macroquistes, proteínas antigénicas, respuesta inmune, protocolos de inoculación.

SUMMARY

The aim of this study is to evaluate the immune response of large and small macrocystic *S. aucheniae*; inoculation using three protocols. Alpaca meat samples were sent to sarcocistiosis CAMALES Huancavelica from the Laboratory of Veterinary Parasitology, where macrocystic were collected and classified by size, in macrocystic small (1-3 mm.) And large (> 5 mm). antigenic proteins were obtained from each group, and their protein concentrations of 3.229 mg / ml and 2.445 for large macrocystic mg / ml for macrocystic small steps by the method of Biuret. Were immunized two groups of 15 rabbits with antigenic protein derived from macrocystic "big" and "small" in *S. aucheniae* and each group was divided into 3 subgroups of rabbits 5 ea; where protocols were applied for inoculation of 1 and 2 months' duration, with antigenic proteins inactivated with formalin and the other with heat-inactivated antigenic protein with a length of 2 months. Subsequently, sera were detected the presence of specific response between Ag and Ab in the two types of test macrocystic by double agar gel immunodiffusion (AGID). Finding a 100% response in protocols I and II evaluated macrocystic large and 60% with protocol III. With regard to small macrocystic was 100%, 60% and 40% of Ag and specific Ab response in the first, second and third inoculation protocol respectively. Antigens macrocystic obtained a large response of 86.6% of cases while the small antigen macrocystic was a 66.6%. Accordingly antigenic protein extracts from *S. macrocystic* large *aucheniae* showed a greater immune response than those of small macrocystic, using three protocols of immunization. However, Fisher's analysis, no association was observed between protocols and Ag-Ab reaction.

Keywords: *Sarcocystis aucheniae*, macrocystic, antigenic proteins, immune response, inoculation protocols.

I. Introducción

Sarcocystis sp es un parasito perteneciente a phylum Apicomplexa, conjuntamente con *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum*, tiene su ciclo de vida indirecto, es decir de tipo predador-presa. Afecta a una amplia gama de mamíferos que actúan como hospederos intermediarios, donde se lleva acabo la fase asexual y se desarrollan los quistes que se ubican en la musculatura esquelética y cardiaca (Leguía *et al*, 1989). Los carnívoros (gatos y perros), en su mayoría actúan como hospederos definitivos, desarrollando la fase sexual del parásito, liberando al medio ambiente esporoquistes u ooquistes infectivos.

En el Perú, se ha reportado la presencia de Sarcocistiosis en diferentes especies domésticas. En camélidos sudamericanos (CSA), se han reportado tres especies: *Sarcocystis tilopodi* (sin *Sarcocystis guanicoecanis*), ocasiona quistes macroscópicos en guanacos, mientras en alpacas y llamas se presenta *S. lamacanis* que produce quistes de menor tamaño (microquistes) son de rápido desarrollo y tienden a localizarse en la musculatura cardiaca y *S. aucheniae* produce quistes macroscópicos de 0.1 a 1 centímetro de largo, de un color blanco con apariencia de un grano de arroz compacto, los que tiende a crecer lentamente y se encuentra presente principalmente en el esófago, cuello, costillas, brazuelo, lomo, pierna o cualquier lugar del músculo esquelético (Guerrero y Hernández., 1967; Castro, 1974; White, 1998). Estos quistes se observan a simple vista, por tal motivo, ocasiona grandes perdidas económicas por el decomiso por parte del inspector veterinario (Vilca, 1991);

así como, al rechazo en su consumo debido a su mal aspecto de la carne, limitándose su comercialización, a pesar de los beneficios que presenta debido a su alto valor proteico y bajo contenido de colesterol comparando con otras carnes rojas (Leguía *et al*, 1989)

Esta parasitosis se diagnóstica observando los quistes presentes en la carcasa; sin embargo una técnica de diagnóstico de *S. aucheniae* en el animal vivo, fue realizada por Sam (1988), quien llegó a caracterizar parcialmente los componentes antigénicos del quiste y estandarizar la prueba de ELISA, la cual viene siendo utilizada como técnica estándar de diagnóstico. Sin embargo, esta técnica muestra reacción cruzada entre las especies de *S. lamacanis* y *S. aucheniae* (Sam, 1988). A pesar que Hung (2005) mediante la técnica de PCR, remarca la diferencia antigénica entre ambas especies y a partir de esa premisa ha elaborado una vacuna, la cual se encuentra en fase experimental.

Recientemente se han hallado diferencias biológicas significativas en perros inoculados con macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* de diferentes tamaños grandes y pequeños (Cornejo *et al.*, 2007). Motivo por el cual, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar la respuesta inmune de macroquistes pequeños y grandes de *S aucheniae*; utilizando tres protocolos de inoculación

II. Revisión Literaria

2.1 Sarcocistiosis:

La sarcocistiosis es una infección parasitaria causada por varias especies de protozoos del género *Sarcocystis*; de amplia distribución mundial (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Fue reportada por primera vez en Suiza (1843) por Miesher, quien encontró en el músculo esquelético del ratón (*Mus musculus*), lo que llegó a conocerse como túbulos de Miesher (Dubey, 1976; Levine, 1986).

El género *Sarcocystis* está compuesto por más de 130 especies (Tenter, 1995), los cuales se diferencian en el grado de patogenecidad, estructura y en su ciclo de vida. Levine (1986) hace referencia de los siguientes autores que proponen la siguiente clasificación taxonómica:

- Phylum APICOMPLEXA Levine, 1970
- Clase SPOROZOASIDA Leuckart, 1879
- Subclase COCCIDIASINA Leuckart, 1879
- Orden EUCCIDIORINA Léger y Diboscq, 1910
- Suborden EIMERIORINA Léger, 1911
- Familia SARCOCYSTIDAE Poche, 1913
- Subfamilia SARCOCYSTINAE Poche, 1913
- Género SARCOCYSTIS, Lankester, 1882

En el caso de *Sarcocystis aucheniae* se describe en 1903 por Brumpt como nombre específico de todos los sarcocystis de camélidos sudamericanos (Torres *et al.*, 1981), posteriormente en 1989 Leguía *et al.*; proponen llamar *S. aucheniae* a aquel que produce macroquistes en las fibras musculares esqueléticas y son de “maduración lenta” y *S. lamacanis* a aquel que produce microquistes en la musculatura cardíaca y son de maduración rápida. La terminología se utiliza por ser observables a simple vista los macroquistes a partir del año y medio (Guerrero y Hernández, 1967; Leguía y Clavo, 1989; Leguía y Arévalo, 1990; La Perle *et al.*, 1999).

2.2 Especies de Sarcocystis:

La mayor parte de *Sarcocystis* encontrados en animales domésticos son especie-específico para sus hospedadores intermediarios y familia-específico para hospedadores definitivos. Sin embargo los hospedadores intermediarios así como también los definitivos pueden ser infectados por diferentes *Sarcocystis* sp. No explicándose aun como diferentes *Sarcocystis* infectan a un mismo hospedador (Tenter, 1995).

La denominación de las distintas especies del género, es por la combinación de los nombres genéricos de los hospedadores intermediarios con los definitivos, es decir, dicha denominación indica la relación biológica que existe entre ambos. Por ejemplo, que un sarcosporidio que realiza el ciclo entre oveja y perro habría que denominarlo *S. ovicanis* (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Numerosas especies fueron llevadas a esta nueva denominación creando confusión entonces se dio prioridad al Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, haciendo prevalecer el nombre original, invalidando parte de las nuevas denominaciones que son transformadas en sinónimos.

En el caso de bovinos se han reportado tres especies de *Sarcocystis*: *Sarcocystis cruzi* sin *S. bovicanis*. *Sarcocystis hirsuta* sin *S. bovifelis*, y el *Sarcocystis hominis* sin *S. bovi hominis* (Soulsby, 1987). Siendo el mas patógeno *Sarcocystis cruzi*, el cual produce cuadros clínicos agudos tanto naturalmente como experimentalmente (Soulsby, 1987; Dubey, 1989).

Los ovinos pueden ser parasitados por cuatro especies de sarcocystis: *Sarcocystis tenella* sin *S. ovicanis*, *Sarcocystis gigantea* sin *S. ovifelis*, *S. arieticanis* y *S. medusiformis*. Siendo el *Sarcocystis ovicanis* el mas patógeno, que produce microquistes (Levine, 1986; Dubey, 1989) *Sarcocystis tenella* y *Sarcocystis gigantea* son de distribución mundial, *Sarcocystis arieticanis* ha sido encontrado en Europa, Australia, Nueva Zelanda y los Estados Unidos; y el *Sarcocystis medusiformis* ha sido encontrado en Australia y Nueva Zelanda (Dubey *et al*, 1989)

Los caprinos pueden ser parasitados por tres especies: *Sarcocystis capracanis*, *Sarcocystis hircicanis* y el *Sarcocystis capra felis* (*S. movei*), (Levine, 1986).

Los porcinos pueden ser parasitados por tres especies: *Sarcocystis miescheriana* (sin. *S. suicanis*) cuyo hospedador definitivo es el perro, lobo, zorro y mapache; mientras que para el; *S. porcifelis* es el gato y *S. sui hominis*, que tiene al hombre chimpancé, mono rhesus como hospedador definitivo (Levine, 1986; Soulsby, 1987).

En los equinos se han reportado infecciones por *Sarcocystis bertrami*, *Sarcocystis equicanis* y *Sarcocystis fayeri*, los cuales tienen como hospedero definitivo al perro (Levine, 1986; Soulsby 1987; Dubey, 1989). Sin embargo,

algunos autores consideran que los equinos son infectados por una sola especie de *Sarcocystis* y que el tamaño de los quistes así como su morfología no son suficiente para la diferenciación del *Sarcocystis* sp. En equinos (Tenter, 1995) también se ha descrito *Sarcocystis neurona* en donde los equinos actúan como hospederos aberrantes porque solo se han encontrado con ellos esquizontes y merozoitos (no quiste) (Dubey *et al.*, 1991; Dubey *et al.*, 2001).

Sarcocystis sp. Detectados también en: venados (Dubey *et al.*, 1989), équidos (Davis *et al.*, 1991) cebú (Odening *et al.*, 1996), búfalo de agua (Huong *et al.*, 1997), bisonte (Fisher y Odenning., 1998), jirafa (Bengins *et al.*, 1998), lagarto (Volf *et al.*, 1998), nutria marina (Lindsay *et al.*, 2001), mapaches (Hamir y Dubey., 2001), periquitos (Dubey *et al.*, 2001). Armadillo (Tamhauser *et al.*, 2001) y en humanos (Agarwal y Srivastava, 1983).

El hombre es el hospedero definitivo de *Sarcocystis bovi hominis* y *Sarcocystis sui hominis*. Pero al parecer actúa también como hospedador intermediario del *Sarcocystis lindemanni*, que desarrolla sarcoquistes en sus músculos esqueléticos. Se desconoce el hospedero definitivo del *sarcocystis lindemanni* (Soulsby, 1987; Tello, 2000).

En el caso de camélidos sudamericanos se han reportado tres especies de *Sarcocystis*: en alpacas y llamas encontramos *Sarcocystis aucheniae* (Torres *et al.*, 1981) que produce quistes macroscópicos y *Sarcocystis lamacanis*, propuesta por Leguía *et al.* (1989), la cual produce quistes microscópicos y el *Sarcocystis tilopodi*, (sin *Sarcocystis guanicoecanis*) reportados en guanacos en Argentina (Quiroga *et al.*, 1969). Mientras que Hung. (2005), Realizo un análisis filogenético de las especies de *Sarcocystis* que afectan a las alpacas, basando el estudio en el gen de la subunidad

pequeña del RNA ribosomal (SSU rRNA), y determinó que la especie productora de microquistes (designada como *S. lamacanis*) pertenece a otra especie, diferente a la que produce macroquistes (*S. aucheniae*); es decir que ambas constituyen especies diferentes.

2.3 Características Morfológicas del Parasito:

Sarcocystis aucheniae dentro de su ciclo biológico tiene diferentes formas parasitarias y estas son:

2.3.1 Ooquistes

Los ooquistes están esporulados cuando son eliminados en las heces y contienen dos esporoquistes, cada uno con cuatro esporozoitos (Urquhart *et al.*, 2001). Se encuentran libres en las heces; los cuales se pueden identificar morfológicamente porque tienen un tamaño aproximado de 12-16 x 9-11um. Son elipsoides, carecen de cuerpo de stidae y en su interior tienen aparte de los esporozoitos, contienen un residuo granular disperso en forma de mórula, ubicado lateralmente en cada uno de los polos (Cordero del campillo *et al.*, 1999). En el caso de *Sarcocystis aucheniae* las medidas de los esporoquistes son 15,16 -16,10 x 10,48-11,20 (White, 1998)

Los esquizontes que se encuentran en células endoteliales de los hospederos intermediarios son de pequeño tamaño y mide de 2-8 um. De diámetro (Urquhart *et al.*, 2001).

2. 3.2 Quistes

Los quistes que se encuentran en la musculatura esquelética generalmente se localizan mayormente en el cuello, esófago, muslo, intercostales y diafragma (Valderrama, 1999) del hospedero intermediario y tiene forma de granos de arroz (Barriga 2002) llegando a medir de 0,1 – 1cm de largo a mas (Leguía, 1991). Presentan 3 tipos de bradizoitos o cistozoitos; cistozoito ameboideo, cistozoito redondo o metrozoito y el cistozoito en forma de plátano, que presentaron diferencias en cuanto a forma, densidad electrónica y organelas (Melo *et al.*, 1992). Son de forma ovoide o esferoidal, contiene una estructura compleja; posee una cápsula con digitaciones externas (citofanereas) las que varían en número largo y grosor; de la misma cápsula se desprende tabiques incompletos dirigidos al centro, entre los que se ubican los paquetes de parásitos, recibiendo aquí el nombre de merozoitos, quistozoitos o bradizoitos (Atías, 1995). Según estudio realizado con microscopio electrónico, se ha podido determinar las ultraestructuras tanto externas como internas del macroquiste de *Sarcocystis aucheniae*.

En un estudio de la biología celular de *Sarcocystis* sp realizado por Melo (2003) utilizando microscopia óptica y electrónica. En el músculo estriado de la alpaca (*Lama pacos*) se determino la presencia de 4 tipos de pared quística en los quistes maduros aislados de músculo esquelético. Los macroquistes tipo 1 tienen profusiones ramificadas o de coliflor y los macroquistes tipo 2 tienen las profusiones en forma de lengua; ambos tipos de macroquistes presentaban una capa estriada en al superficie de la protusion. Los microquistes maduros presentaron 2 tipos de pared quística, uno de ellos, el tipo 3 presento protusiones cortas similar a dedos cortos regordetes con protuberancias cilíndricas delgadas que en cortes transversales le dan la apariencia de timón de barco; el tipo 4 presento profusiones delgadas y cortas.

2.4 Ciclo Biológico:

Los miembros de este genero son protozoo intracelulares obligatorios y como toda coccídea, su ciclo de vida consiste en merogonia, gametogonia y esperogonia (Tenter, 1995). El *sarcocystis* sp es de ciclo indirecto, requiere de dos hospedadores obligatorios donde se desarrollan el estadio sexual (predador, hospedador definitivo) y el estado asexual (presa, hospedador intermediario), (Leguía, *et al.*, 1989).

El parásito vive y se reproduce sexualmente en el intestino del perro y elimina grandes cantidades de esporoquistes en las heces dependiendo del *sarcocystis* de camélido y de la evolución de infección en el perro. La eliminación continua por un periodo de 4-8 semanas, luego de la cual se produce la reproducción espontánea (White, 1998).

El hospedador definitivo se infecta al alimentarse de un animal (presa) o carne infectada con *sarcocystis*, los bradizoitos son liberados por la digestión en el estomago e intestino del predador, estos se mueven activamente e ingresan a la pared intestinal donde se dividen en gametos (femenino y masculino). La gametogonia se produce durante las primeras 18 horas (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). Produciéndose luego la fecundación y dando como resultado los ooquistes (zigotes). Los cuales esporulan en la lamina propia del intestino produciendo dos esporoquistes y cada uno con cuatro esporozoitos y al poseer una membrana muy frágil esta se romperá en el transito intestinal y dejaran libres a los esporoquistes los cuales se observan en mayor proporción en las heces. El periodo prepatente es de 7-12 días y el pasaje de ooquistes dura entre 15-45 días (Levine, 1986; Soulsby, 1987; Dubey, 1989; Rojas, 1990; Mehlorn, 1993; Barriga, 2002). En el caso de *Sarcocystis aucheniae* el periodo prepatente es de 11 a 20 días y el patente de 20 a 41 días (Leguía *et al.*, 1989).

En el estudio realizado por Cornejo *et al.*, (2007), clasificó a los macroquistes de *S. aucheniae* en pequeños (1-3mm) y grandes (>5mm) para evaluar la relación de estos con su viabilidad en caninos; demostrando que los

de menor tamaño presentaban un período prepatente (PPP) mas corto (11-12 días) que los que recibieron macroquistes de mayor tamaño (15-18 días). Además, que la carga de esporoquistes eliminados en las heces de perros infectados con los macroquistes pequeños fue mayor en comparación con los macroquistes grandes y se encontró una mayor mortalidad en caninos infectados con macroquistes pequeños de *S. aucheniae*.

El hospedador intermediario adquiere la infección al ingerir alimento (pasturas) o agua contaminada con los esporoquistes, liberándose los esporozoitos en el intestino para luego entrar a la circulación sanguínea y desarrollar la primera generación de esquizontes en las células endoteliales o subendoteliales de los vasos sanguíneos de casi todos los órganos. Los merozoitos producidos en la primera generación de esquizontes entran a nuevas células endoteliales y subendoteliales donde se realiza la segunda generación de esquizontes. La segunda generación de merozoitos entran a la células musculares esqueléticas, cardíacas y algunas veces también en las células del sistema nervioso central donde se realiza la tercera generación de esquizontes, la que finalmente termina conformado el quiste (sarcoquiste) que pueden ser microquistes y/o macroquistes, en cuyo interior se forma los bradizoitos o cistozoitos. Con la ingestión del sarcoquiste por el predador, se cierra el ciclo. De la ingestión de esporoquistes a la presencia de bradizoitos infectantes en los músculos de los hospederos intermediarios generalmente son de 2-3 meses pero pueden extenderse en 12 meses en algunas especies (Levine ,1986; Soulsby, 1987; Rojas ,1990; Cordero del Campillo *et al*, 1999 Urquhart *et al.*, 2001). En alpacas los quistes de *S. aucheniae* alcanzan su mayor tamaño y madurez entre 14-18 meses aproximadamente y *S. lamacanis* a partir de los 4-5 meses (Leguía *et al.*, 1989).

2.7 Patogenia y signos clínicos:

Entre los factores relacionados a la patogenia. La especie de *Sarcocystis* es el mas importante, de ella depende la capacidad de multiplicación, la localización de las merogonias, la proliferación de los merontes y la posibilidad de alcanzar el SNC, potencialidad que confieren a las distintas especies un poder patógeno mayor o menor (Cordero del Campillo *et al.*, 1999) como en el caso de *Sarcocystis neurona* en caballos donde el parasito afecta el SNC produciendo signos clinicos como caminar tambaleando, incoordinación del tren posterior, ataxia, parálisis, decúbito y muerte. También juegan un papel importante la dosis infectante, las reinfestaciones en relación con las especie de *sarcocystis* (Rojas, 1990). Entre los factores dependientes del hospedador definitivo están el estrés, la gestación, el estado nutricional, la lactación como predisponentes que favorecen la gravedad de la infección.

2.7.1 Hospedero definitivo

El consumo de carne cruda infectada con quistes de *Sarcocystis* puede ocasionar en perros una enfermedad grave. Presentando un cuadro con fiebre, falta de apetito, anemia, diarrea sanguinolenta, debilidad, tembladera, postración y muerte (Leguía y Casas, 1999).

Se ha constatado que determinadas sustancias obtenidas a partir de extractos acuosos de bradizoitos lisados, a los que se les da el nombre de Sarcocistina (sustancia proteica al cual posee una endotoxina con actividad neurotoxina). Cuya acción se manifiesta a nivel del músculo cardiaco y tejido nervioso gastrointestinal (Leguía *et al.*, 1989)

Experimentalmente se ha demostrado, que los microquistes de *Sarcocystis lamarcaensis* pueden ser altamente patógenos en los perros. Cachorros infectados presentaron a los 10 días post infección síntomas clínicos caracterizados por anorexia, pirexia (41°C.), palidez de las membranas mucosas, diarrea mucosanguinolenta, incoordinación y postración, muriendo dos días después. A la necropsia se observó la mucosa del yeyuno e íleon con contenido biliar, hiperemia, edematosa y congestionada, mucosa del colon con hemorragia. Los otros cachorros del mismo estudio presentaron una ligera diarrea mucosa entre los días 9-14 post infección. Por otro lado perros inoculados con macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* presentaron una diarrea mucosa (Leguía *et al.*, 1989).

Estudios realizados por Cornejo *et al.* (2008) infectando cachorros con macroquistes grandes (>5mm) y macroquistes pequeños (1-3mm) obtuvieron 58% de mortalidad en cachorros infectados con macroquistes pequeños, frente al grupo de macroquistes grandes, donde obtuvieron sólo un 30%. En el caso de macroquistes pequeños los animales murieron entre 1-6 días post infección y otro animal murió en el octavo día. Mientras los individuos de macroquistes grandes murieron a los 6 días post infección y otro cachorro al cuarto día. Todos mostraron signos clínicos caracterizados por pérdida de peso, anorexia, pirexia, palidez de las mucosas, incoordinación y diarreas; los animales muertos del grupo de macroquistes grande mostraron diarrea mucosa, mientras que los del grupo de macroquistes pequeños fueron del tipo diarrea mucosanguinolenta.

El consumo de carne infectada, cruda o insuficientemente cocida, produce en el humano un cuadro de gastroenteritis con náuseas, diarrea, cólicos y escalofríos, sintomatología aparentemente ocasionada por la acción de una sustancia tóxica contenida en los quistes; sin embargo, se sostiene que

en la carne de alpaca procesada como charqui se pierde la viabilidad del parásito y se inactiva la toxina Sarcocistina (Leguía, 1991). La sarcocistosis muscular también ocurre en el hombre. Se conocen unos 40 casos, distribuidos en diferentes partes del mundo. No ha podido determinarse la especie o especies de *Sarcocystis* causantes de esta infección (Beaver et al., 1979 citado por Acha y Szyfres, 1986).

2.7.2 Hospedero intermediario

En el hospedero intermediario esta enfermedad ha sido considerada tradicionalmente de escasa importancia patológica, sin embargo, se ha demostrado que causa destrucción masiva del endotelio vascular de capilares y arteriolas de casi todos los órganos del animal, como consecuencia de la reproducción asexual del parásito (Leguía y Casas, 1999). También la muerte puede ser inducida natural o experimentalmente por especies patogénicas de *Sarcocystis* cuando un gran numero de esporoquistes es ingerido en un corto periodo de tiempo.

La multiplicación del parásito (las esquizogonias) en las células endoteliales determina la rotura de las células hospedadoras radicadas en la intima del vaso, causando endoarteritis y aumento de la permeabilidad capilar, que favorece la salida de líquidos, sangre y células móviles. En algunos casos, se producen alteraciones morfológicas mas profundas que afectan a la capa muscular, con vacuolización e infiltración leucocitaria en la túnica media, sobre todo en los vasos de mediano calibre. Los restos de células rotas que

permanecen en la pared de las arterias, como los liberados a la corriente, desencadenan en vasos pequeños y capilares un aumento de la presión sanguínea por obstrucción de su luz y, consecuentemente, edemas y hemorragias (Cordero del Campillo *et al.*, 1999). La fiebre acompaña la parasitemia y en la enfermedad experimental coincide con el momento de maduración de los esquizontes de primera y segunda generación. La lesión vascular parece constituir una parte esencial de la patogenia de la enfermedad. Se ha propuesto que el parásito induce un retraso del crecimiento debido a las modificaciones en las concentraciones plasmáticas de somatostatina (hormona que se libera en el hipotálamo y controla a la hormona del crecimiento) y de hormona del crecimiento, así como a las alteraciones en las interacciones de las citocinas con el sistema endocrino (Fayer y Elasser, 1991).

Una respuesta restauradora de la endoarteritis de la activación del fenómeno de fijación de los trombocitos y de los sistemas de coagulación sanguíneos que estimulan la formación de microtrombos y retardan el flujo sanguíneo, causantes de una coagulopatía sistémica (coagulación intravascular diseminada) con propensión a las hemorragias. Durante el proceso de coagulación se producen sustancias, como el factor XII de Hageman, que aparte de provocar la producción de sustancias vasoactivas que favorecen al aumento de permeabilidad capilar, activa el sistema de fibrinólisis y consecuentemente el inicio de la cascada del complemento, donde algunos de sus componentes tiene también acciones quimiotácticas y vasoactivas, coadyuvantes en la formación e incremento de los edemas, hemorragias y áreas de infiltración leucocitaria (cuadro I)

Algunos autores han apuntado, además, la participación de fenómenos inmunitarios, en los que los antígenos liberados por las formas parasitarias intracelulares serían procesados por la célula hospedadora endotelial, que

actuaría como célula presentadora de antígenos, que junto con los antígenos de tipo II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) localizados en su superficie, podrían ser reconocidos por linfocitos T sensibilizados, con capacidad para liberar linfocinas. El resultado es una respuesta inmunitaria agresiva que tiene en el endotelio vascular, como la descrita en riñón, hígado y pulmón del ganado vacuno, caracterizada por una reacción inflamatoria local, con acumulación de mononucleares en los tejidos vasculares, semejante a una reacción de hipersensibilidad tipo IV. (Cordero del Campillo *et al.*, 1999)

Cuando la fase proliferativa de los sarcocystis se produce en hembras gestantes, la multiplicación asexual tiene lugar en los cotiledones de la placenta, en las células mioepiteliales y raramente, en los anejos fetales. El resultado es la aparición de amplias áreas de infiltración de mononucleares y necrosis titulares. Una consecuencia de dichas lesiones son las muertes fetales y los abortos, generalmente hacia la segunda mitad de la gestación (Bottner *et al.*, 1987).

La fase quística es caracterizada por dos tipos de lesiones: la miositis eosinofílica y la formación de granulomas. La primera ha sido descrita frecuentemente en la vaca y esporádicamente en oveja y cabra, y se ha relacionado con la existencia de altos niveles de IgE y altas intensidades de parasitación muscular. Es mas propia de animales infectados naturalmente, sometidos a infecciones reiteradas, que de animales infectados experimentalmente. El otro tipo de reacción, mas frecuente y constante, es la infiltración perivascular de mononucleares y en las zona periféricas de las fibras musculares parasitadas aparentemente sanas. La reacción mas notable se produce en las células musculares en proceso de degeneración, con quistes abiertos, donde abundan los neutrófilos y mononucleares, entre los que

destacan los macrófagos. Estos procesos evolucionan hacia la formación de granulomas de células gigantes, o hacia la fibrosis y calcificaciones que dificultan la fisiología de la contracción muscular (Cordero del campillo *et al.*, 1998).

La aparición de miodistrofias, más o menos generalizadas, conducen a la aparición de trastornos relacionados con el lugar en que se asientan. De esta manera se pueden detectar trastornos de la masticación, insalivación y deglución, cuando las miodistrofias se localizan en la musculatura de la cara, lengua, faringe y esófago; trastornos de la micción, por ejemplo anuria, cuando afectan el esfínter vesical; de la locomoción, cuando afectan la musculatura esquelética, e incluso de la funcionalidad cardíaca (Radostis *et al.*, 2002)

Los sarcoquistes inmaduros en el músculo se pueden detectar a los 45-60 días de la ingestión de esporoquistes, y son infectivos aproximadamente a los 70 días. (Fayer y Dubey, 1986).

La localización de los quistes en el SNC determina la aparición de una meningoencefalitis no purulenta causante de las alteraciones neurológicas que acompaña, en muchos casos a las sarcocistiosis (Radostis *et al.*, 2002)

Por otra parte, se ha constatado que determinadas sustancias obtenidas a partir de extractos acuosos de bradizoitos lisados (Sam, 1988) a las que se les ha dado el nombre genérico de sarcocistina, cuando se administra intravenoso a conejos, son capaces de producir hemorragias, parálisis, edemas e incluso la muerte. Posiblemente la ruptura de los quistes con liberación y muerte de los bradizoitos, bastante frecuente tanto en infecciones naturales como experimentales, podrían tener una acción toxica semejante a la descrita por Von Brand (1979).

La gravedad de la enfermedad y el grado de infección de los tejidos que se observa en la necropsia en los casos inducidos experimentalmente aumentan en relación con el tamaño de la dosis infectiva. El número de infecciones asintomáticas probablemente refleja la ingestión inicial de unos pocos esporoquistes que provocan un fuerte estado de inmunidad frente a los estímulos posteriores. Los brotes de la enfermedad clínica son probables cuando los grupos de los animales que no han presentado exposición previa a la infección son puestos súbitamente en contacto con una contaminación intensa, especialmente la producida por perros y gatos (Leguía *et al.*, 2001)

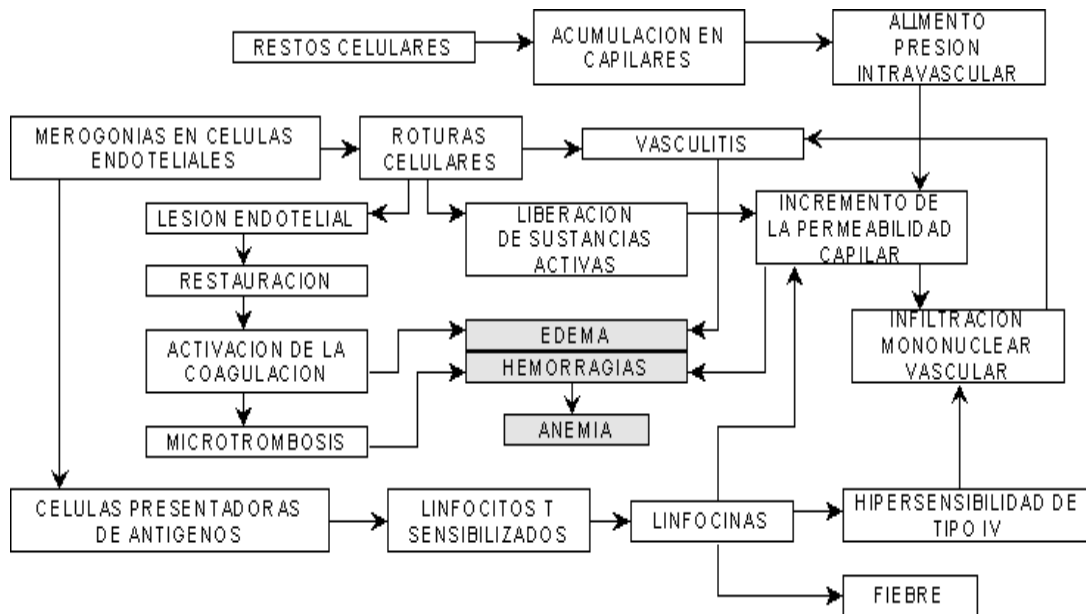
Estudios realizados para conocer los signos clínicos de esta enfermedad, concluyen que se pueden dividir en sobreaguda, aguda y crónica (Dubey, 1989).

Los signos clínicos de la enfermedad sobreaguda no son muy evidentes, caracterizados principalmente por fiebre recurrente que coinciden con la parasitemia y leve lesión orgánica (Radostis *et al.*, 2002).

La fase aguda de la enfermedad es la más peligrosa, dependiendo de la cantidad de esporoquistes ingeridos (Leguía y Clavo, 1989) y la edad del animal (Castro *et al.*, 2004), presentando fiebre, salivación, anemia, anorexia, disminución de la producción, disminución de la ganancia de peso, pérdida de peso, aborto, postración y muerte generalmente 20 a 30 días después de la infección. Estos síntomas se producen cuando el parásito en su fase de segunda generación de esquizontes sale al torrente sanguíneo, destruyendo muchas células del epitelio vascular (arterias) provocando múltiples hemorragias en diferentes órganos del cuerpo (Sam, 1988; Dubey, 1989; Leguía y Clavo, 1989).

La fase crónica no tiene signos clínicos visibles, se manifiesta cuando la alpaca consume pequeñas cantidades de esporoquistes durante largo tiempo, produciendo pequeñas hemorragias internas no detectables y se manifiestan con retardo en su desarrollo, poca ganancia de peso, fatiga, dificultad para respirar después de caminatas normales (Ramírez *et al.*, 1998; Leguía y Clavo, 1989). Esta fase se relaciona con la presencia de quistes como grano de arroz, blanquecinos, en la musculatura esquelética y cardíaca, continuando dividiéndose con un metabolismo bastante alto (Leguía y Casas, 1999). Se presume que los signos de la fase crónica se deben a la presencia de la toxina (Sarcocistina) en la sangre, toxina que es mortal para conejos (Sam *et al.*, 1988).

Cuadro I: Mecanismos patogénicos de la sarcocistiosis



Fuente: Cordero del Campillo *et al.*, (1999)

2.8 Epidemiología:

La Sarcocistiosis constituye la principal causa de decomiso de carnes de camélidos, al igual que en otras especies (Alva *et al.*, 1980; Vilca, 1991).

Alva *et al.*, (1980) señala a la Sarcocistiosis en segundo lugar como causal de decomiso de carnes de alpaca infectada con *Sarcocystis aucheniae*, se decomiso en esa fecha 878,208 kilos en un año en el camal de Santa Rosa (Puno), a consecuencia de la alta prevalencia (89%-100%) visto en alpacas (Leguía y Clavo, 1989; Castro *et al.*, 2004) y 98.4% en llamas (Castro, 1974).

Prevalencia que en algunos casos llega al 100% de los animales mayores de 2 años de edad (Mostajo, 1983) todo esto revela los altos niveles de contaminación de los pastizales con esta coccídea.

2.8.1 Transmisión:

La estrecha convivencia que hay entre las alpacas, llama con los perros, y la alimentación de estos con carne infectada favorece la transmisión (horizontal) de este parásito a esto se le adiciona la excesiva población de perros en las zonas ganaderas y la acción predadora de zorros; los cuales no desarrollan inmunidad, debido a la ausencia de reproducción asexual, siendo re infectados continuamente, eliminando millones de ooquistes por periodos prolongados (Leguía y Casas., 1999).

Existen grandes niveles de contaminación del medio ambiente con este parásito, ya que los perros después de la ingestión de microquistes y macroquistes eliminan millones de esporoquistes que son inmediatamente infectivos y por un largo periodo de tiempo (Leguía *et al.*, 1989).

2.8.2 Factores de riesgo:

2.8.2.1 Clima

Resistentes a las formas ambientales, en condiciones experimentales se demostró que pueden sobrevivir a la congelación mas no a la desecación (Radostis *et al.*, 2002). En consecuencia los esporoquistes pueden sobrevivir

por largo tiempo en zonas húmedas, superar el invierno, mas no en climas secos y calurosos (Moro *et al.*, 1987).

Estacionalidad este se encuentra en toda las estaciones del año, sin embargo los pastos se contaminan con mayor cantidad de esporoquistes durante la época lluviosa, ya que estos lavan el material fecal favoreciendo el esparcimiento de estos parásitos (Moro *et al.*, 1987; Leguía y Clavo, 1989).

2.8.2.2 Edad de los Animales

Se ha comprobado que al edad representa un factor de riesgo de la infección (Castro *et al.*, 2004). La alpaca puede contraer la enfermedad desde el nacimiento, al recibir muy poca protección a través del calostro (Leguía y Clavo, 1989)

Sarcocystis aucheniae es no patógeno sin embargo a la hora de beneficiar los animales se encuentran infecciones masivas en la carne del camélido, reflejadas por gran cantidad de quistes que suscitan perdidas económicas en la inspección y muchas veces el decomiso de las carnes, perdiendo su valor comercial (Guerrero, 1971; Alva *et al.*, 1980; Leguía y Clavo, 1989).

2.8.3. El sistema de manejo

En CSA se especula la posibilidad de la crianza conjunta de alpacas, llamas, perros sirva de determinate de la alta prevalencia de la infección; pero no se descarta la participación de canidos silvestres (Leguía *et al.*, 1989).

En el hospedero definitivo adquiere principalmente la infección en ambientes rurales por la practica frecuente de alimentar con restos de camales, trozos de huesos, despojos, recortes de piezas cárnicas y vísceras crudas conteniendo quistes (Atías, 1995). La falta de mataderos o camales en algunas zonas altoandinas. Hace que se practique la matanza clandestina o domiciliaria, así como también los camales dentro de los centros urbanos donde los perros vagabundos roban la carne y vísceras enfermas decomisadas (Leguía y Clavo, 1989; Leguía y Casas, 1999).

Los perros no desarrollan inmunidad protectora, así que pueden infectarse cada vez que comen carne cruda con quistes, es decir se pueden reinfectar continuamente, resultando una nueva onda de ooquistes que contamina el ambiente resultando en un excelente difusor del parásito (Leguía y Clavo, 1989; Rojas, 1990). El hombre, gato, felinos silvestres, hasta donde se conocen no intervienen en el ciclo de los *Sarcocystis* de CSA. (Leguía *et al.*, 1989).

2.9 Inmunología.

2.9.1 Estructura Antigénica

Los componentes antigénicos del *Sarcocystis aucheniae* fueron caracterizados parcialmente mediante la separación electroforética en el gel SDS poliacrilamida al 10% que reveló la existencia 9 polipéptidos en el rango de 13 KDa a 124 KDa de peso molecular para el lisado de macroquistes y 7 polipéptidos entre 12 KDa a 130 KDa para el lisado de microquistes. Estas proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa reaccionaron frente a los sueros anti-sarcocystis. Por otro lado, con el análisis inmunológico de estos

antígenos mediante la prueba de inmunodifusión doble en gel agar contra sueros inmunizados de conejo, se mostraron tres bandas de precipitación para el lisado de macroquiste y dos para el microquiste, siendo una de ellas común para los dos extractos (Sam, 1988).

En otro estudio, Sam *et al* (1996) encuentran 15 bandas proteicas entre 25 a 127 KDa para lisados de macroquiste de *Sarcocystis aucheniae*, en gel SDS PAGE al 15%. Sin embargo, Cabrera (1996) encuentra 7 bandas proteicas de importancia localizadas entre 190 a 33.5 KDa de peso molecular.

Se ha observado que los *Sarcocystis* son resistentes a la respuesta inmune del huésped y no hay evidencia de una respuesta inmune capaz de proteger (Quiroz, 2000).

Las diversas formas evolutivas que se desarrollan en el transcurso de la infección, contienen distintos tipos de proteínas antigénicas, cuyos pesos moleculares difieren tanto en función de la especie, como en la forma parasitaria por eso, la detección de anticuerpos circulantes así como su concentración y evolución, también son valores variables, dependiente de la técnica empleada como también de la fuente de antígeno (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

Es poco conocido los procesos de respuesta inmune específica contra infecciones por *sarcocystis*. Investigaciones han demostrado que se produce respuesta tanto de linfocitos B como linfocitos T, siendo la respuesta celular muy importante (Uggla y Buxton, 1990). El endotelio infectado por *sarcocystis* puede funcionar como células presentadoras de antígeno durante la fase vascular de la proliferación del parásito.

2.9.2.1 Respuesta inmune humoral

La respuesta inmune humoral se relaciona también con el ciclo del parásito. No obstante se han podido comprobar en bovinos la existencia de IgG e IgM. La primera se puede detectar a partir de las 4-5 semanas, el pico máximo se produce durante el proceso de maduración de los quistes, luego tienden a descender, aunque manteniendo niveles positivos, para desaparecer a las 5-6 meses. La IgM es de aparición mas precoz, sobre las 3-4 semanas y su cinética de producción es muy semejante a la de la IgG, aunque tienden a desaparecer un poco antes, alrededor de los 2-3 meses (Gasbarre *et al.*, 1984). En el caso de cerdos se observó que hubo un incremento de IgM a partir de los 21 días pi (post-infección) y posteriormente un descenso paulatino hasta el día 80 pi, en que los valores son ya insignificantes. Las IgG presentan valores positivos a partir de los 34 días pi y se mantienen como mínimo hasta los 160 días (Weyreter *et al.*, 1984). La reducción en el título de anticuerpos, esta posiblemente relacionado con la calcificación de los quistes (Quiroz, 2000).

Una inmunidad protectora se ha encontrado en cerdos infectados con dosis subclínicas (1,000 esporocistos). Por lo que son capaces de resistir el embate de infecciones letales realizadas a los 40 días post infección de la primera. Dicha inmunidad viene definida por la protección del hospedador frente a la intensidad de las manifestaciones morbosas, pero nunca sobre la instalación y desarrollo de quistes musculares. (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

2.9.2.2 Respuesta inmune celular

En cuanto a la inmunidad celular fenómenos de movilización celular, principalmente mononucleares, que participan en la resolución del proceso mediante una inmunidad mediada por células, que se produce en los tejidos parasitados. También se ha comprobado la existencia en la sangre periférica de una inmunidad celular específica, caracterizada por una estimulación de la transformación linfoblástica, frente a antígenos específicos de *Sarcocystis* que se mantiene durante un año (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

La intensidad de la respuesta celular vista en animales que sobrevivieron a desafíos letales indica inmunidad mediada por células contra *Sarcocystis*. (Dubey, 1989). Se ha estudiado, además; que en ratones inoculados con *Sarcocystis cruzi*, activan a los macrófagos y producen FNT alfa y esto también puede liberarse por los LPS que produce el parásito (Nakamura *et al.*, 1999).

Es evidente que existe una inmunidad humoral y celular detectable *in vitro*. Sin embargo, cuando se realizan pruebas *in vivo*, de transferencia o administración de sueros homólogos inmunes, no existe ningún tipo de inmunidad adquirida y los animales, cuando son infectados, desarrollan un proceso patológico semejante al de los animales no inmunizados. Existe una inmunidad protectora, como la que se produce en animales que han sufrido un proceso subclínico experimental, y por el cual cuando son infectados con dosis de recuerdo teóricamente letales, son capaces de resistir el embate de esta segunda dosis. La duración de esta inmunidad protectora varía entre 3-4 meses según la especie y es independiente de la existencia de quistes en la musculatura. La forma parasitaria responsable de este fenómeno parece ser

los merotes de 1era generación, pero no se sabe con exactitud, como tampoco los mecanismos conductuales a la instauración de un estado inmunitario (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

En el caso de los camélidos sudamericanos no se han realizado estudios sobre la inmunidad celular. Solamente se analizo la respuesta de anticuerpos IgG anti *Sarcocystis* en alpacas, con resultados positivos donde se enfrento por los métodos de Electroinmunotransferencia (Sam *et al.*, 1996) y ELISA (Castro *et al.*, 2004), sueros colectados de animales vivos contra un antígeno soluble a partir de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*.

2.4 Pérdidas Económicas:

La sarcocistiosis produce grandes pérdidas económicas ya sea en la salud de los animales o en la reducción en la calidad y cantidad de la carne, lana, fibra (Leguía y Arevalo 1990). También produce perdidas en el valor comercial de la carne por el decomiso de la carcasa (Alva *et al.*, 1980). Las pérdidas anuales estimuladas por el decomiso de carcasas infectadas con macroquistes de *Sarcocystis* se encuentran bordeando los \$300,000 dólares americanos (Leguía, 1991). En un 80% se observa la presencia de macroquistes en alpacas mayores de 2 años siendo menor en alpacas menores del año (Leguía y Casas, 1999).

Se demostró en un estudio realizado en el camal de Santa Rosa (lugar Puno) que una de las causas principales de decomiso de carcasa es por debido a la presencia de quistes de *Sarcocystis aucheniae*. (Alva *et al.*, 1980).

Según el Ministerio Nacional de Agricultura (2004) alrededor de 500 mil familias campesinas de la región andina se benefician directamente de la

actividad productiva de los camélidos sudamericanos y los ingresos generados por estos productores fluctúan entre 300 a 500 dólares por familia al año.

2.5 Importancia en La Salud Pública:

La sarcocistiosis esta incluida dentro de las enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) y esta considerado como una zoonosis toxica debido a que se han reportado evidencia de trastornos gastroentericos en personas que consumieron carne insuficientemente cocida, infectada con *Sarcocystis aucheniae* (Leguía , 1989). Dentro del genero *Sarcocystis* otras especies que también causan cuadros gastrointestinales en los humanos son: *Sarcocystis suihominis*, *Sarcocystis boviominis* (Atías ,1995).

El humano se infecta por consumir carne poco cocida de res, de cerdo infectado con *Sarcocystis boviominis* y *S. suihominis* respectivamente (Atías, 1995). En el caso de los individuos que ingieren carne de alpaca, llama infectada, principalmente niños, presentan dolores estomacales, a la vez escalofríos, nauseas y vómitos, lo que generalmente los pobladores atribuyen a la frescura de la carne de la alpaca o llama (Leguía y Clavo ,1989).

El hombre al parecer actúa como hospedador intermediario del *Sarcocystis lindemanni*, que desarrolla sarcoquistes en sus músculos esqueléticos. Se desconoce el hospedero definitivo del *sarcocystis lindemanni* (Soulsby, 1987; Tello, 2000). Sarcocistiosis muscular en el hombre ha sido notificada en Egipto, India, Malasia y Tailandia generalmente la presencia es fortuita y obedece al examen de tejido muscular que se realiza para investigar otras causas. Si bien la infección es casi asintomática, en algunos casos se ha

observado debilidad muscular, dolores musculares, miositis, pericarditis y tumefacción subcutánea. Sin embargo, en ninguno de los casos hubo pruebas concluyentes para señalar a los quistes musculares como causa cierta de manifestaciones clínicas (Acha y Syfres, 1986)

2.10. Diagnóstico:

2.10.1 En el hospedero definitivo:

Se realiza a través del examen coproparasitológico de los canidos. (Alva *et al.*, 1981; Cordero del Campillo *et al.*, 1999) mediante el método de concentración por flotación con solución azucarada (Rojas, 1990).

Para diagnosticarse se debe buscar en las deposiciones los ooquistes maduros de tipo isospora de unos 12-15 x 16-20 y/o los esporoquistes de unos 12-10 x 15 um con cuatro esporozoitos en su interior (Barriga, 2002).

2.10.2 En el hospedero intermediario:

El diagnóstico in vivo de la Sarcocistiosis aguda es difícil toda vez que los síntomas no son muy específicos y por tanto, fácilmente confundibles con otros procesos patológicos. No obstante, algunos datos clínicos como la anemia, fiebre, sialorrea, alopecia e incremento de los niveles de las enzimas plasmáticas (GOT, CPK y LDH) pueden ofrecer un valor orientativo (Rojas, 1990) Mas eficaz resulta la utilización conjunta de estos con criterios epidemiológicos donde la existencia de antecedentes de sarcocistiosis musculares en determinados animales, así como información obtenida por análisis coprológico de los hospedadores definitivos, preferentemente del perro, son de especial interés para el establecimiento del diagnóstico.

Las necesidades de diagnosticar la enfermedad en vivo, hizo que las investigaciones se dirigieran a desarrollar y estandarizar pruebas de diagnostico para detectar anticuerpos contra Sarcocystis en animales vivos. Actualmente se han desarrollado diversas pruebas para la detección de anticuerpos contra sarcocystis. Entre ellas están la HAI, la prueba de IFI, la prueba de ELISA, la prueba de EITB, y la prueba de Aglutinación Directa.

2.10.2.1 Técnicas Serológicas:

2.10.2.1.1. Prueba de Aglutinación Indirecta (HAI).

En un estudio empleando la prueba HAI se detecto anticuerpos en vacas experimentalmente infectadas con sarcocystis. Se empleo antígeno soluble preparado de bradizoitos obtenido de corazón de bovino infectado experimentalmente. Los títulos de HAI aumentaron a los 30 días después de la infección y tuvieron un máximo a los 90 días. Se considero que títulos de HAI 1: 1458 a mas podrían ser considerados como diagnostico significativo de sarcocistiosis aguda en bovinos. Asimismo, esta prueba no reacciona positivamente a la presencia de anticuerpos contra Toxoplasma en sueros positivos en HAI para Toxoplasmosis (Lunde y Fayer, 1977). Estos resultados son similares a los hallados en un brote de Sarcocistiosis en bovinos lecheros en Australia (Carrigan ,1986).

2.10.2.1.2 Inmunodifusión doble

Técnica utilizada para determinar una reacción de antígeno y anticuerpo. Se conocen tres patrones básicos de reacción: Identidad, no identidad e identidad parcial. Para esta prueba se utiliza azarosa, la cual se prepara hirviendo lentamente los gránulos en un baño de agua. La mayoría de

los tipos de azarosa se disuelven a un poco más de 90 °C y melifican a 45°C. En el soporte de azarosa se colocan el antígeno y el anticuerpo (siempre es necesario conocer uno de ellos, pues el desconocido será el que se trata de identificar); ambos migran en todas direcciones y cuando encuentran a su contrario presentan una banda de precipitación fácilmente observable. Esta técnica constituye la base común de una gran variedad de técnicas que permiten realizar desde un análisis cualitativo hasta una estimación cuantitativa de un antígeno (Orlando y Kuby, 2003).

2.10.2.1.3. Prueba de ELISA.

La prueba serológica mas utilizada para el diagnostico de *Sarcocystis* es la prueba de ELISA. En China, se evaluó la prueba de ELISA para detectar anticuerpos contra *Sarcocystis* en bovinos infectados naturalmente. Los resultados de la prueba se compararon con los resultados de la inspección macroscópica y microscópica de las carcasas. Se detectaron anticuerpos específicos en el 79,25%, mientras que bradizoitos fueron detectados en el 77,36% y quistes en el 64.78% de los bovinos. La sensibilidad y especificidad fueron 99% y 91% respectivamente. No se detecto reacción cruzada con anticuerpos contra *Toxoplasma gondii* (Shi *et al.*, 1987). Por otro lado en el Perú se desarrollo una prueba de ELISA con alta sensibilidad para la detección de anticuerpos contra *Sarcocystis aucheniae* de alpacas. La prueba se estandarizo con antígeno de *Sarcocystis aucheniae* y suero de conejos antimacroquistes de *Sarcocystis aucheniae* (Sam 1988, Ramírez *et al.*, 1998) con al finalidad de mejorar la especificidad en al detección de anticuerpos de alpacas con la técnica de ELISA se estandarizo un método utilizando Proteína A conjugada con peroxidada, resultando ser una opción confiable ya que fue capaz de detectar anticuerpos en pequeñas cantidades y con buena especificidad. (López y González., 1992).

Se han comparado dos tipos de antígeno de *Sarcocystis cruzi*, uno aislado de merozoitos y el otro aislado de bradizoitos, mediante la prueba de ELISA en bovinos infectados naturalmente. Ambos antígenos detectaron anticuerpos pero se obtuvieron mejores resultados para detectar animales infectados y no infectados con el antígeno de merozoitos (Savini *et al.*, 1996). Cuando se emplea antígeno de merozoitos se detecta incrementos en los niveles de IgG mas temprano que cuando se emplea antígenos de bradizoitos, que coincide con la presencia de signos clínicos, lo cual hace suponer que IgG Elisa usando antígenos de merozoitos es el adecuado para el diagnostico de *Sarcocystis* aguda en bovinos (Savini *et al.*.,1996)

El ELISA estandarizado por Hung (2005) en un estudio de diagnostico en alpacas menores de 2 años de vida. Fue basado en proteínas antigénicas de macroquistes de *S. aucheniae* y fue capaz de detectar anticuerpos tanto de *S. aucheniae* como de *S. lamacanis*. Esto es de gran utilidad debido a lo dificultosa que resulta la obtención de antígeno de *S. lamacanis* (microquistes). Donde se concluye también que era la prueba de elección en el diagnostico temprano.

2.10.2.1.4. Prueba de inmunofluorescencia indirecta (IFI)

La prueba de IFI resulta mas sensible que la prueba de ELISA para periodos mas tempranos en la infección con *Sarcocystis muris*, entre los 11 y 25 días después de la infección, frente a los 18 a 49 días del ELISA (Tenter, 1995). En otro estudio, donde se empleo como antígeno los cistozoitos de *S. gigantea* para la prueba de ELISA e IFI, no mostraron reacción cruzado con *Toxoplasma gondii*.

2.10.2.1.5. Western Blot

La prueba de EITB se utilizó para la detección de IgG anti *Sarcocystis aucheniae* en conejos. Se encontraron tres péptidos con movilidad relativa entre 58-50 kd que fueron reconocidos por las IgG de conejos hiperinmunizados (Sam *et al.*, 1996). Posteriormente se desarrolló y estandarizó una prueba de EITB para la detección de anticuerpos anti *Sarcocystis*. Se utilizaron sueros hiperinmunes de conejo anti *S. aucheniae* y suero de alpacas infectadas naturalmente confirmadas mediante necropsia como sueros positivos. Para los testigos negativos se emplearon sueros de alpacas negativas confirmadas mediante necropsia y procedentes de zonas libres de Sarcocistiosis. Asimismo se utilizaron sueros de alpacas neonatas que no ingirieron calostro. Los sueros de alpacas positivas para los testigos negativos se emplearon sueros de alpacas negativas confirmadas mediante necropsia y procedentes de zonas libres de Sarcocistiosis. Asimismo se utilizaron sueros de alpacas neonatas que no ingirieron calostro. Los sueros de las alpacas positivas a *Sarcocystis aucheniae* tuvieron una reacción fuerte con bandas comprendidas entre 58 a 50 KDa, mientras que los sueros negativos y los sueros de los animales neonatos no mostraron ninguna reacción (Sam *et al.*, 1998).

Actualmente la prueba de EITB es la prueba estándar para el diagnóstico serológico de la Mieloencefalitis Equina por protozoarios (producida por *S. neurona*). Se ha estimado que tiene un 89 % de sensibilidad y 89% de especificidad (Dubey *et al.*, 2001). A diferencia que la prueba de aglutinación directa para la detección de anticuerpos a *Sarcocystis neurona* tiene una sensibilidad de 100% y una especificidad de 90% en animales infectados experimentalmente (ratones). Además esta prueba no requiere equipamiento especial (Lindsay *et al.*; 2001).

Las pruebas inmunológicas tradicionales basadas en la detección de anticuerpos específicos a *Sarcocystis* solo pueden llegar al diagnóstico de género mas no pueden diferenciar entre especies de *Sarcocystis* que infectan a la misma especie animal (Gasbarre *et al.*, 1984). Sin embargo algunos trabajos de investigación han determinado que utilizando antígeno recombinante de *Sarcocystis tenella* en la técnica de ELISA se puede llegar a diferenciar infecciones de *Sarcocystis tenella* con infecciones de *Sarcocystis arieticanis* o *Toxoplasma gondii*. Este antígeno podría ser útil para la estandarización de una prueba serológica de diagnóstico de *Sarcocystis tenella* en ovinos (Mertens *et al.*, 1996).

2.10.2.1.6. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

A pesar de la importancia de la sarcocistiosis para la industria ganadera y la medicina veterinaria, aun no se cuenta con una prueba de diagnóstico de rutina que nos permita diferenciar entre las especies de *Sarcocystis* que pueden infectar un animal. Sin embargo, con la técnica de PCR se pueden realizar el diagnóstico de especies de sarcocystis (Tenter *et al.*, 1995 Joachin *et al.*, 1996). Esta técnica ha sido desarrollada como una herramienta para la diferenciación genética de distintos organismos y se basa en la amplificación genómica del ADN de esta manera se pueden obtener "huellas digitales" de casi cualquier organismo (Joachim *et al.*, 1996). Se sabe que los ovinos pueden ser infectados por cuatro especies de *Sarcocystis* de los cuales *Sarcocystis tenella* y *Sarcocystis arieticanis* son patógenas (produciendo abortos y enfermedad aguda, o enfermedad crónica), y las pruebas tradicionales de diagnóstico no pueden diferenciar entre estas especies y las especies no patógenas. Sin embargo se identificó un fragmento de ADN (pstf 10 hibridizado) con PCR que puede ser usado como marcador genético que se enlaza con el ADN específico para especies patógenas de ovinos *Sarcocystis tenella* y *Sarcosystis arieticanis* (Joachin *et al.*, 1996).

La prueba de PCR (basados en una pequeña subunidad de secuencia de gen de ARN ribosomal de *Sarcocystis tenella* y *Sarcocystis arieticanis*). Específicamente detecto ADN de especies homologas en muestras de sangre de ovinos, y no mostró reacción cruzada con especies heterólogas (*Sarcocystis gigantea*), ni con especies cercamente relacionadas como *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* (Heckerroth *et al.*, 1999).

En un estudio realizado por Hung, (2005) mediante el análisis del gen SSU rRNA de las especies de *Sarcocystis* que infectan a las alpacas del Perú. Para un diagnostico temprano en animales menores de 2 años. El PCR estandarizado en el presente estudio fue capaz de detectar la infección activa de *Sarcocystis* en sangre de animales infectados cuando el parásito se encuentra en sangre periférica. Sin embargo, el PCR carecería de utilidad para detectarlo en fechas posteriores de la infección. Por tanto, el ELISA sería la técnica de elección para la detección temprana en sangre por tener un rango de tiempo mayor de detección.

2.11 Prevención y Control:

En la actualidad no existen medidas destinadas a mejorar la resistencia inmune de los rebaños, teniendo en conocimiento esto, la única forma de evitar la enfermedades es interrumpiendo el ciclo biológico del parásito, lo cual se lograría evitando a través de la mala costumbre de alimentar a los perros pastores con carne, vísceras crudas e infectadas con este parásito (Leguía y Clavo., 1989; Ramírez *et al.*, 1998; Leguía y Casas 1999).

Con respecto a los planes de lucha, estos se basan en intentar cortar el ciclo evolutivo de los parásitos en aquellos puntos de la cadena epidemiológica mas condicionada por la acción del hombre y, por lo tanto, mas susceptibles de ser atacados; para ello habría que atender a los siguientes apartados.

Educación sanitaria sostenida que logre instalarse valorativa y actitudinalmente en el intelecto de las personas.

1. Enseñando a los productores la forma como se contagia o transmite la enfermedad y los prejuicios que ocasionan a los animales y al hombre.
2. No alimentar perros con carne, vísceras crudas o mal cocidas que presentan triquina, aracillo, bolsa de agua, los cuales también pueden desarrollarse en el hombre.
3. Prohibir la matanza clandestina o domiciliaria de alpacas construyendo camales en zonas urbanas y rurales donde se realice la inspección sanitaria por el Medico Veterinario.
4. Mejorar las condiciones higiénico sanitarias de los camales urbanos, evitando el ingreso de perros a los camales
5. No debe sacarse del camal carne o vísceras infectadas sin autorización del Médico Veterinario.
6. No dejar abandonado en el campo las alpacas o llamas muertas por diversos motivos, los cuales pueden ser comidos por perros, zorros o lobos.
7. Enterrar o quemar animales muertos cuyas carnes no se ven. No se entiende este
8. Limitar la población de perros a 2 por familia en las zonas rurales y áreas urbanas. Las acciones deben entenderse como actividades en pro de tales mascotas, no en contra de ellos.
9. Realizar campañas para reducir la población de perros vagabundos, zorros, lobos.
10. La carne de alpacas o llamas con sarcocystis puede ser sometida a tratamientos a fin de evitar su decomiso: utilizándolo como charqui

En un estudio realizado para establecer la frecuencia de esporoquistes u ooquistes de *Sarcocystis* sp eliminados por los perros pastores de alpacas en Marangani, Cuzco (Choque *et al.*, 2007) encontró que el 56% de perros pastores eliminó esporoquistes reafirmando el rol importante que juega la población canina en la difusión de esta enfermedad.

Evitar que el hospedero definitivo difunda al *sarcocystis* con sus heces es la llave para eliminar la expansión de la infección de *sarcocystis* (Leguía y Clavo., 1989; Ramírez *et al.*, 1998; Leguía y Casas, 1999).

También se realizaron experimentos , donde los perros alimentados con carne congelada(-10x10días), cocida por 5 minutos y deshidratada (charqui), no eliminaron esporoquistes, lo cual evidencia que la cocción, congelación y deshidratación de carne infectada con micro y macro quistes de *sarcocystis* constituyen medios efectivos para la destrucción e inactivación de este parásito; en cambio, la refrigeración(4°C x 30 días) no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad de los quistes ya que los perros inoculados de este grupo eliminaron esporoquistes entre 10 y 12 días post infección (Leguía y Arevalo, 1990).

2.12 Tratamiento:

En el hospedero intermediario no se dispone de un tratamiento eficaz, pero el Amprolio y la Salinomicina pueden aliviar los síntomas. Se ha demostrado que el amprolio a dosis de 100 mg por Kg. de peso por día desde

el momento de la inoculación reduce la gravedad de la infección en terneros y corderos infectados experimentalmente y también se ha usado para el control de un brote en ovejas. El tratamiento de los terneros infectados experimentalmente con Salinomicina 4 mg por Kg en 30 días redujo la gravedad de la enfermedad (Radostis, 2002).

En los caballos con mieloencefalitis se le recomienda Pirimetamina 0,25mg por Kg. una vez al día con Trimetropin-Sulfadiazina 15mg por Kg. cada 12 horas por 6 -12 semanas.

En el caso de los CSA se viene estudiando la utilización como el Ponazuril (Lindsay *et al*, 2001).

En el caso de los hospederos definitivos se están usando drogas para controlar la sarcocistiosis intestinal utilizando la combinación de drogas Sulfadoxina y Piretamina, así como Primaquina, donde obtuvieron 100% eficacia luego por el tratamiento por 7 días (Saravia, 2003; Quispe, 2004).

Toltrazul tiene efecto con solo una aplicación, así como lo demostró Dausches *et al.* (2001) lograron inhibir la eliminación de esporoquistes en perros infectados experimentalmente y naturalmente con dosis 10, 20, 30 mg/Kg al 5%.

El toltrazuril al 2.5% en dosis de 10 ó 20 mg/kg de peso vivo, aplicado al 5° ó 7° día post-infección no fue efectivo para el control de la sarcocistiosis intestinal en perros infectados experimentalmente con microquistes (Vilca *et al.*, 2007)

Sin embargo en otro estudio utilizando el Toltrazuril 2.5% a dosis de 15mg/kg y la combinación de Piretamina y Sulfadoxina a dosis de 20mg/kg y 1mg/kg encontrándose que el Toltrazuril al utilizar por 5 días consecutivos un 100% de eficacia en el control de la sarcocytiosos canina en comparación con las otras drogas utilizadas (Barrientos *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos son muy

alentadores pero su uso por días consecutivos no es práctico para nuestra realidad.

III. Materiales y Métodos

3.1 Lugar de Estudio:

La obtención de muestras se realizó en el camal de Pilpichaca en el departamento de Huancavelica.

Para el procesamiento de las muestras fueron llevadas al laboratorio de Parasitología-UNMSM, departamento de Lima.

3.2 Material de estudio.

- a. **Carne de Alpacas.** En el camal de Huancavelica se obtuvieron cuellos infectados con macroquistes, visibles a simple vista, las mismas que fueron transportadas en recipientes herméticos a baja temperatura y mantenidas en bolsas estériles.
- b. **Animales de laboratorio.** Se usaron 30 conejos con edades variaban de 2,5 a 3 meses de vida y cuyos pesos oscilaban entre 2.2 a 3.0 kilos, todos ellos procedentes del bioterio de la FMV-UNMSM. Antes de ser utilizados en los experimentos, fueron examinados mediante técnicas coproparasitológicas, para descartar la presencia de formas parasitarias gastrointestinales, siendo seleccionados sólo los animales que se hallaban negativos. Los conejos fueron colocados en jaulas individuales de 0.5m² y recibieron alimentación comercial y agua *ad libitum*.

3.3 Tamaño Muestral

Al ser un estudio donde se va a determinar si existe diferencia inmunológica entre dos macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*. Enfrentando antígenos de los dos macroquistes con suero de conejos inmunizados. Debido a esto la cantidad de conejos requeridos para la obtención de sueros híperinmunes, se baso en otro estudio similar, donde se utilizaron 30 animales para identificar las proteínas de la membrana glicosomal de *Leishmania Mexicana*; y observar las diferencias inmunogenicas enfrentando con suero de ratones inmunizados (De Jesús *et al.*, 1999).

3.4 Distribución de los animales de laboratorio

La medición de las respuestas inmunes, se realizó dos grupos de 15 animales c/u, tratados con inóculos de proteínas provenientes de macroquistes de *S. aucheniae* grande y pequeño respectivamente. Posteriormente cada grupo fue dividido en 3 sub grupos de 5 conejos c/u, para seguir un protocolo de inoculación.

3.5. Procedimiento experimental

3.5.1 Obtención del antígeno proteico crudo y preparación de los inóculos.

3.5.1 .1 Obtención de los macroquistes.

Los macroquistes de *S. aucheniae*, fueron recolectados de la musculatura esquelética de las alpacas. Los macroquistes colectados, fueron depositados en PBS (Solución Buffer Fosfato) y a una temperatura baja (2-3°C) para su posterior procesamiento:

- 1) Se recolecto de la musculatura esquelética de alpacas, principalmente de la región del cuello, quistes intactos de *S. aucheniae*, con la ayuda de un equipo de disección básico.
- 2) Se lavo los macroquistes liberados con PBS (solución buffer fosfato) + antibiótico (penicilina 100 UI + estreptomicina 100 mg), posteriormente fueron clasificados según su tamaño, en quistes grande (>5mm) y quistes pequeños (1-3mm), mediante una regla esterilizada.
- 3) Mediante una canaleta, pinza plana y jeringa de tuberculina se rompieron cuidadosamente los macroquistes, para obtener los bradizoitos y una baja proporción de capas del quiste, que fueron usados como antígeno. Posteriormente los (bradizoitos) fueron destilados utilizando un embudo conteniendo una gasa estéril. El filtrado fue llevado a un tubo falcón conteniendo PBS y antibiótico (penicilina 100 UI + 100mg estreptomicina), siendo centrifugado en tres oportunidades, a 500 RPM por 15 minutos, lográndose un sedimento inicial.
- 4) Se coloco el sedimento en un beaker de 10 ml y llevado a sonicación a 60 ciclos por un promedio de 2 minutos. Obtenido el sonicado (solo si se obtuvo un solución consistente se agrego PBS), nuevamente fue centrifugado a 1,4000 RPM por media hora y se obtuvo un sobrenadante, que finalmente fue filtrado a través de un filtro 0.22um. El filtrado tanto de los macroquistes grandes y pequeños, debidamente identificados fueron envasados en viales de 1.5 a 2 ml y conservados en congelación.
- 5) Se midieron los niveles de proteína de cada lote de antígeno mediante el método de biuret y se realizo un cultivo bacteriológico garantizando su esterilidad.



Fig1. Carne de alpaca infestada con macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*.



Fig. 2. Recolección de macroquistes.

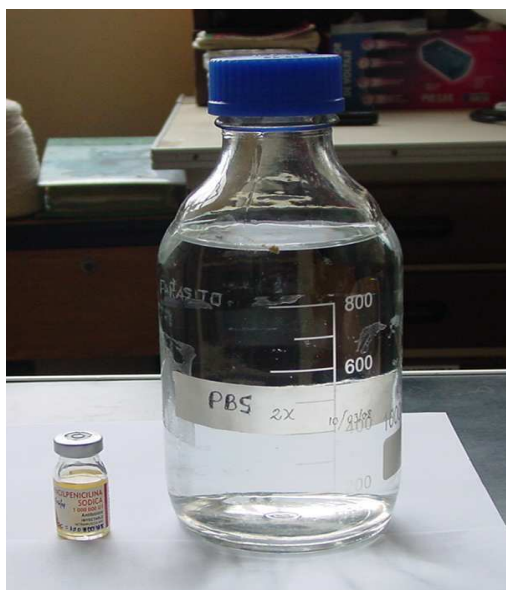


Fig.3. Lavado de los macroquistes con PBS y antibiótico.

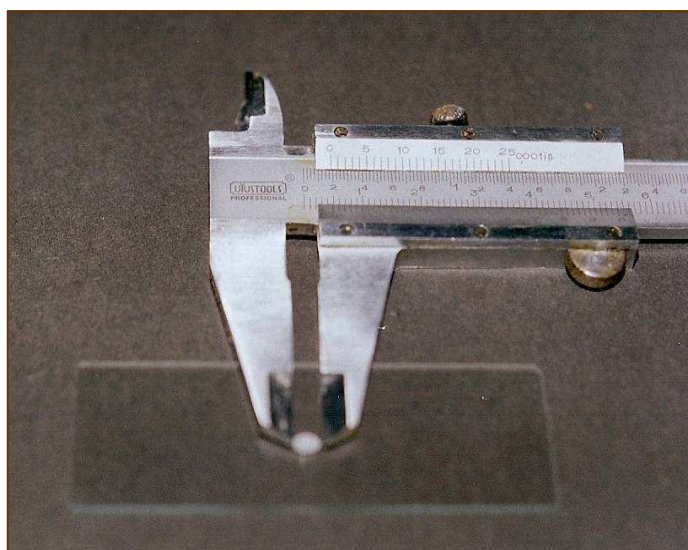


Fig. 4. Clasificación de los macroquistes

3.5.1.1. Medición de proteínas mediante el método de Biuret

El método de Biuret, fue usada para determinar la cantidad de proteínas la misma que es directamente proporcional a la intensidad de color, la reacción es bastante específica, de tal manera que pocas sustancias interfieren, en su procesamiento, dando lugar a un complejo de color púrpura al reaccionar con una solución de sulfato de cobre en medio alcalino. Las proteínas reaccionan de un modo semejante. Los iones cobre forman un complejo de coordinación con cuatro cuerpos NH nucleófilos del biuret, que en el caso de las proteínas provienen de los enlaces peptídico de los aminoácidos. La sensibilidad del método es muy baja y sólo se recomienda para la cuantificación de proteínas en preparados muy concentrados (Bradford, 1976; Arce *et al.*, 2007).

Procedimiento.

La técnica utilizada fue la descrita por Gormall *et al* 1949; donde se utilizaron sulfato de cobre pentahidratado (1.5g) y tartrato sódico-potasico tetrahidratado (6g). Ambos reactivos fueron disueltos en 500 ml de agua destilada, añadiéndose posteriormente 300 ml de NaOH al 10%, luego se agregó agua destilada hasta un litro en un matraz. Además, se adicionó 1g de ioduro potasio para prevenir la formación y precipitación de ácido de cobre. En 1 ml de muestra, con un contenido de proteína entre 0.5–10 mg, se añadió 4 ml del reactivo anterior, tras su agitación se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos y se leyó el incremento de la absorbancia a 550nm frente a un blanco sin proteína.

Los resultados se extrapolan a una gráfica patrón confeccionada con concentración conocida de seroalbumina bovina. Siendo los resultados obtenidos únicamente indicativos, ya que esta técnica solo es absolutamente fiable en las proteínas cuya solución al 1% presenta una extensión de 8.9 a 280nm y una relación entre las extensiones a 280nm y 260nm de 1.75nm.

3.5.1.3. Prueba de esterilidad

Esta prueba tiene como objetivo indicar la presencia de vida microbiana dentro del preparado de los macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* para que no produzca alteraciones en la antigenicidad del preparado e Interferir con los resultados del estudio. Dentro de los medios de cultivos utilizados para la identificación de diferentes agentes bacterianos. Están los cultivos aerobios como: Agar Trypticasa de soya (TSA), caldo Trypticasa de soya, Agar Mac Conkey, Caldo verde brillante, Caldo Tetrationato y entre los medios para el aislamiento, identificación y conservación de hongos patógenos, saprofitos y levaduras se hayan los cultivos anaerobios como: Caldo Tryoglicolato, Agar Sabaraud glucosado.

3.5.2. Utilización de formaldehído y tratamiento térmico para la Inactivación del antígeno de *S. aucheniae*.

Los métodos de Inactivación mas usados son formaldehído, hidróxido de aluminio y efecto térmico, mayormente su uso para inactivar vacunas bacteriológicas.

- El tratamiento térmico es usado en los procesos de aislamiento y purificación de componentes celulares termoestables, como el LPS (Lipopolisacaridos) pueden verse beneficiados con este método empleado, porque las altas temperaturas pueden provocar la desnaturalización de componentes celulares como las proteínas termolabiles, contribuyendo a la eliminación de estas como posibles contaminantes y dejando intactas las proteínas termoestables responsables de la antigenicidad (Lebeque *et al*, 2003). En el caso de *Sarcocystis cruzi* se demostró que la fracción proteína termolábil del extracto proteínico quístico de *Sarcocystis* es responsable de la toxicidad (Nakamura *et al.*, 1999)

- El adyuvante según estudios aumenta la respuesta inmunológica este incremento en la inmunogenicidad se debe a una mejor captura de antígeno, a una prolongada presencia del mismo *in situ* en consecuencia una más prolongada respuesta inmunológica (Arce *et al.*, 2007). Su función es retardar la liberación del antígeno y favorecer su captación por los macrófagos, ayudando de esta forma a presentar el antígeno a los linfocitos T (Arce *et al.*, 2007).
 - El adyuvante completo de Freund (ACF) es una emulsión agua-aceite compuesto de un antígeno en una emulsión salina en aceite mineral con micobacterias (*Mycobacterium tuberculosis*) muertas por el calor la cual potencia mas la producción de anticuerpos. Su presencia incrementa la formación de anticuerpos, pero produce la formación de granulomas en el sitio de inyección (Arce *et al.*, 2007).
 - Adyuvante incompleto de Freund (AIF). La cual es similar a la anterior produciendo un aumento de la producción de anticuerpos, pero sin micobacterias en consecuencia no produce la formación de granulomas.

3.6. Preparación del inoculo inactivados con formol y manejo de protocolos de 2 y 1 mes de duración.

Los protocolos de inmunización se basaron en la inactivación de la proteína antigénica cruda a través de una dilución de formol hallada en el estudio, la cual tiene por ventaja su bajo costo y como limitante su poder corrosivo al producir lesiones granulomatosas. La concentración de formol hallada fue aplicada en los protocolos de un mes (Bonilla y Zavaleta, 1997) y de dos meses (Sam, 1988).

La cantidad de antígeno para preparar el inoculo se calculó inicialmente según el método establecido por Sam (1988), la cual indicó una concentración de 0,05mg por kilogramo de peso vivo del conejo, agregándose luego la dilución de formol 0.4%, la cual fue modificada como se indicará posteriormente.

Seguidamente, se agregó PBS 2x y adyuvante en la proporción del 90% en base a la cantidad de antígeno. Toda esta emulsión se homogenizó con una jeringa de tuberculina y aguja de 21 x ½.

3.7. Preparación del inóculo, inactivado con tratamiento térmico: para protocolo de 2 meses de duración.

Los protocolos de inmunización se basaron en la inactivación de la proteína antigénica cruda a través del tratamiento térmico y la aplicación del protocolo de dos meses (Marín, 1993), y la cantidad de antígeno se obtuvo inicialmente, según el método descrito por Sam (1988)

Los antígenos de macroquistes (Marín, 1993) fueron diluidos en tampón de pH7 y envasados en viales de 200ul, siendo calentados, en agitación constante de 70°C hasta llegar a 100°C durante 15 minutos en baños termoestables de agua o glicerina; posteriormente las soluciones se enfriaron rápidamente en un baño de agua de hielo (2-3°C), homogenizando a centrifugación (500 rpm por 15" segundo), seguidamente se agregó PBS 2x 100ml y en el último paso se añadió el adyuvante en un 50% de la emulsión para luego ser inculado al animal, en dosis decrecientes de antígeno.

3.8. Manejo de Protocolos de inoculación

Se utilizaron tres protocolos de inoculación de proteínas antigénicas crudas para la obtención de anticuerpos, el momento y la vía de inoculación dependió del protocolo establecido. Los conejos fueron observados constantemente una hora antes y 12 horas post inoculación. Así también se monitoreó la temperatura rectal una hora antes y 1 hora post inoculación.

Protocolo I:

Período de inmunización de un mes. Inactivación de la proteína antigénica con formol (Bonilla y Zavaleta, 1997)

| Días de Inmunización | Procedimiento |
|-----------------------------|---|
| 1 | Sangría |
| | Inoculación Fracción de antígeno y Adyuvante de Freund completo + formol 10%. VIA INTRAMUSCULAR |
| 4 | Sangría |
| 5 | Inoculación Fracción de antígeno y Adyuvante de Freund incompleto + formol 10%. VIA SUBCUTANEA |
| 8 | Sangría |
| 9 | Inoculación Fracción de antígeno y Adyuvante de Freund completo + formol 10%. VIA INTRAMUSCULAR |
| 12 | Sangría |
| 13 | Inoculación Fracción de antígeno y NaCl 0.85%. vía INTRAMUSCULAR |
| 22 | Sangría |

Protocolo II

Período de inmunización de dos meses. Inactivación de la proteína antigénica con formol (Sam, 1988).

| Días de Inmunización | Procedimiento |
|-----------------------------|---|
| 1 | Sangría |
| | Inoculación Fracción de antígeno y Adyuvante de Freund completo + formol 10%. VIA INTRADERMICO. |
| 15 | Sangría. |
| 16 | Inoculación Fracción de antígeno y Adyuvante de Freund incompleto + formol 10%. VIA INTRAMUSCULAR y VIA |

| | |
|----|--|
| | SUBCUTANEA |
| 30 | Sangría |
| 31 | Inoculación Fracción de antígeno y Adyuvante de Freund incompleto + formol 10%. VIA INTRAMUSCULAR y VIA SUBCUTANEA |
| 46 | Sangría |
| 47 | Inoculación Fracción de antígeno y Adyuvante de Freund completo + formol 10%. VIA INTRAMUSCULAR y VIA SUBCUTANEA |
| 62 | Sangría |

Protocolo III:

Período de inmunización de dos meses, con inactivación de la proteína antigénica mediante un tratamiento térmico (Marín, 1993). El momento de la inoculación y el momento de la sangría estas estipuladas dentro del protocolo.

| Días de Inmunización | Procedimiento |
|----------------------|--|
| 1 | Sangría |
| | Inoculación Fracción de antígeno y Adyuvante de Freund completo VIA INTRADERMICO |
| 15 | Sangría. |
| 16 | Inoculación Fracción de antígeno y Adyuvante de Freund incompleto VIA INTRAMUSCULAR y VIA SUBCUTANEA |
| 30 | Sangría |
| 31 | Inoculación Fracción de antígeno y Adyuvante de Freund incompleto VIA INTRAMUSCULAR y VIA SUBCUTANEA |
| 46 | Sangría |

| | |
|----|--|
| 47 | Inoculación Fracción de antígeno y Adyuvante de Freund Completo VIA INTRAMUSCULAR y VIA SUBCUTANEA |
| 62 | Sangría |

3.9. Obtención del suero:

Previamente a las inoculaciones y en fechas de programadas, se obtuvo sangre de los animales inoculados a partir de las venas marginal y/o safena o por punción cardiaca. La sangre fue centrifugada a 1500 rpm x 5 minutos.

3.10 Detección de anticuerpos y Técnicas usadas:

Fueron colectados sueros de cada grupo y posteriormente se detectó la presencia de anticuerpos, a partir del día 15; mediante la técnica de inmunodifusión doble en gel agar (Outchterlony, 1958).

3.11 Análisis estadístico

Se usará la prueba exacta de Fisher que permite analizar si dos variables dicotómicas están asociadas cuando la muestra a estudiar es demasiado pequeña y no se cumplen las condiciones necesarias para que la aplicación del test χ^2 sea adecuada. Estas condiciones exigen que los valores esperados de al menos el 80% de las celdas en una tabla de contingencia sean mayores de 5. Así, en una tabla 2x2 será necesario que todas las celdas verifiquen esta condición.

Tabla 1 Tabla de contingencia para la comparación de dos variables dicotómicas, en el caso de grupos independientes.

| | Característica A | | |
|-------------------------|-------------------------|----------------|--------------|
| Característica B | Presente | Ausente | Total |
| Presente | a | b | a + b |
| Ausente | c | d | c + d |
| Total | A + c | b + d | N |

La probabilidad exacta de observar un conjunto concreto de frecuencias a, b, c y d en una tabla 2 x 2 cuando se asume independencia y los totales de filas y columnas se consideran fijas viene dada por la distribución hipergeométrica:

$$p = \frac{(a+b)!(c+d)!(a+c)!(b+d)!}{n!a!b!c!d!}$$

Esta fórmula se obtiene calculando todas las posibles formas en las que podemos disponer n sujetos en una tabla 2×2 de modo que los totales de filas y columnas sean siempre los mismos, $(a+b)$, $(c+d)$, $(a+c)$ y $(b+d)$.

La probabilidad anterior deberá calcularse para todas las tablas de contingencia que puedan formarse con los mismos totales marginales que la tabla observada. Posteriormente, estas probabilidades se usan para calcular valor de p asociado al test exacto de Fisher. Este valor de p indicará la probabilidad de obtener una diferencia entre los grupos mayor o igual a la observada, bajo la hipótesis nula de independencia. Si esta probabilidad es pequeña ($p < 0.05$) se deberá rechazar la hipótesis de partida y deberemos asumir que las dos variables no son independientes, sino que están asociadas. En caso contrario, se dirá que no existe evidencia estadística de asociación entre ambas variables.

IV. Resultados

Los pesos de proteína obtenidas por el método de Biuret, han dado como resultado 3,229 mg/ml para macroquistes grandes y 2,445 mg/ml para macroquistes pequeños.

La dosis mínima de antígeno a usar fue de 0.05 mg/kg, dicha dosis fue hallada en base a un estudio paralelo, donde se inoculó cantidades decrecientes de antígeno en que variaron de 25 a 0.025 mg/kg, observándose el tiempo de sobrevivencia o mortalidad a la dosis administrada (M. Chileno, 2009, comunicación personal)

En el **cuadro 1** se observa la reacción Ag-Ac en un 100% de los animales evaluados. Mediante la prueba de inmunodifusión doble en quistes grandes (> 5mm) de *Sarcocystis aucheniae*, en los dos primeros protocolos (I y II); mientras que con el tercer protocolo presentó un 60%

En el **cuadro 2** se observan las reacciones Ag-Ac mediante la prueba de inmunodifusión doble en macroquistes pequeños (1-3mm) de *Sarcocystis aucheniae*, en el primer, segundo y tercer protocolo de 100%, 60% y 40% respectivamente.

Cuadro 1 Respuesta especifica Ag-Ac en quistes grandes (> 5mm) de *Sarcocystis aucheniae* mediante Inmunodifusión 2008.

| Protocolos de inoculación | Animales de laboratorio | Resultado | (%) |
|----------------------------------|--------------------------------|------------------|------------|
| I | 5 | 5/5 | 100 |
| II | 5 | 5/5 | 100 |
| III | 5 | 3/5 | 60 |

*I proteína antigénica inactivado con formol, 1 mes de inmunización

*II proteína antigénica inactivado con formol, 2 meses de inmunización.

*III proteína antigénica inactivada con tratamiento térmico, 2 meses de inmunización.

Cuadro 2 Respuesta especifica Ag-Ac en quistes pequeños (1-3mm) de *Sarcocystis aucheniae* mediante Inmunodifusión 2008.

| Protocolo de inoculación | Animales de laboratorio | Resultado | (%) |
|---------------------------------|--------------------------------|------------------|------------|
| I | 5 | 5/5 | 100 |
| II | 5 | 3/5 | 60 |
| III | 5 | 2/5 | 40 |

*I proteína antigénica inactivado con formol, 1 mes de inmunización

*II proteína antigénica inactivado con formol, 2 meses de inmunización

*III proteína antigénica inactivado con tratamiento térmico, 2 meses de inmunización.

En el **cuadro 3** se demuestra que hay un 86,6% de respuesta en los macroquistes grandes en comparación con los macroquistes pequeños que solo se observó 66,6%.

Cuadro 3 Respuesta especifica Ag-Ac en macroquistes grandes y pequeños de *S. aucheniae* mediante Inmunodifusión empleando tres tipos de protocolo de inmunización 2008.

| Macroquiste | N° Conejos | Protocolo | | | Resultado | (%) |
|----------------|------------|-----------|----|-----|-----------|------|
| | | I | II | III | | |
| Grande(>5mm) | 15 | 5 | 5 | 5 | 13/15 | 86.6 |
| Pequeño(1-3mm) | 15 | 5 | 5 | 5 | 10/15 | 66.6 |

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó la respuesta inmune de dos tamaños de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* mediante el empleo de tres protocolos de inoculación.

Inicialmente se determinó el peso de la proteína antigénica utilizando el método de Biuret, para los macroquistes grandes y pequeños, obteniéndose los pesos de 3,229mg/ml y 2,445 mg/ml respectivamente. Por otro lado, estudios similares realizados por Mansilla, (1993) y Sam *et al.*, (1999) trabajando sólo con pool de macroquites sin diferenciar tamaños, hallaron pesos moleculares de 5,6 mg/ml y 6,4 mg/ml respectivamente. Mientras que Uzuriaga *et al.*, (2008) quienes trabajando de forma similar encontraron una concentración de proteína de 32mg/ml, a través del método de Lowry. La diferencia de pesos hallados en los diferentes estudios, pudo deberse a los métodos empleados en su detección, así como a las variaciones en los tamaños de quistes usados.

La dosis de antígeno administrada a conejos fue de 0,05 mg/Kg. Esta cantidad se basó en un estudio paralelo (M. Chileno, 2009 comunicación personal), donde se utilizaron concentraciones de proteínas antigénicas que variaron de 25, 10, 5, 0.25, 5, 0.05, 0.025 mg/Kg; encontrándose un 50% de supervivencia a las dosis de 0.025 y 0.05 mg/Kg; optándose por la dosis mayor debido a que, la respuesta inmunológica es dependiente de la dosis, forma y

vía de administración, además el uso de concentraciones muy pequeñas podrían producir tolerancia (Arce *et al.*, 2007).

Paralelamente, para realizar la inactivación del antígeno, utilizada en la obtención de suero hiperinmune se siguió la técnica descrita por (Sam, 1999), donde se recomendaba utilizar la concentración de formol al 0,4%. Sin embargo, se observó, una elevada mortalidad de los conejos (10 animales), los cuales mostraban signos clínicos como postración, disnea, pupila contraída, etc; compatibles con la intoxicación de la sarcocistina (Sam, 1998). Debido a esto se tuvo que variar inicialmente la concentración de formol al 4% (Labeque *et al.*, 2003), sin resultados favorables, por lo que se optó en incrementar la concentración del formol hasta 10%, lográndose la sobrevivencia de los animales inoculados y consecuentemente la inactivación de la sarcocistina. La concentración de formol al 10% fue usada en los protocolos donde se usó al formol como inactivador de proteínas; mientras que el protocolo de inactivación por efecto térmico, siguió los parámetros de Labeque *et al.*, (2003).

Para la inmunización de los conejos, se utilizó simultáneamente la vía de inoculación subcutánea e intramuscular en los protocolos II y III no así, en la primera fase de inoculación de ambos protocolos. Este manejo tiene la ventaja al presentar el antígeno por dos vías, siendo más probable obtener una respuesta inmune óptima. Por otro lado, para incrementar la fagocitosis de las proteínas y consecuentemente la respuesta inmune; los antígenos fueron mezclados con adyuvantes, los cuales actúan de dos maneras; inicialmente protegiendo al antígeno de una dispersión rápida atrapándolos en un depósito local y en segundo lugar al contener sustancias que estimulan la respuesta inmune del huésped, logrando reclutar macrófagos al sitio donde se halla depositado el antígeno, incrementando la proporción local de fagocitosis (Arce *et al.*, 2007).

El uso del adyuvante Freund completo (ACF) e incompleto (AIF). En el caso de ACF produce granulomas debido a la presencia de mycobacterias por este motivo y para evitar efectos indeseados en los animales inoculados, sólo se aplicó ACF en la primera y última fase de los protocolos. Mientras que en los refuerzos se usó generalmente AIF.

De otro lado la técnica utilizada para detectar reacciones inmunes en nuestro estudio fue inmunodifusión doble que constituye una técnica de fácil manejo, al no requerir un equipo especial y no depende de manera importante a las condiciones ambientales (García *et al*, 2000).

En los cuadros 1 y 2 se observa que los extractos de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae*, de dos tamaños (“grande” > 5mm y “pequeño” 1-3mm); evaluados con tres protocolos de inoculación, mostraron que al menos dos conejos de cada protocolo presentaron una respuesta inmune específica, frente al antígeno crudo, usando la prueba de Inmunodifusion doble.

Además, se mostró que el protocolo de un mes de inoculación, inactivado con formol al 10% (protocolo I), produjo una respuesta del 100% tanto para los antígenos provenientes de macroquistes grandes como de pequeños, garantizando la producción de anticuerpos al comparar con los otros protocolos que no ofrecen igual respuesta. Sin embargo, durante el proceso de inmunización, se observó la muerte de seis animales en el día 13 (anexo 1) al dejar de usar formol como inactivador de la proteína antigénica, esto se debió, probablemente a la insuficiente producción de anticuerpos que mostraban en esa fecha los animales, la cual no garantizó la protección ante el efecto de las toxinas de sarcocystis. Comprobándose que la producción de anticuerpos no se producen adecuadamente antes del día 13, al dejarse de usar formol como inactivador de antígeno. Estos animales fueron reemplazados para completar el grupo inmunizado.

En el protocolo II, de dos meses de inoculación inactivado con formol al 10%, se observó que el 100% de los conejos presentaron una respuesta inmune ante los antígenos de macroquistes grandes y solo un 60%, respondió con los antígenos de macroquiste pequeños. Mientras que en el protocolo III, inactivado con calor, se observaron respuesta del 60% en el caso de macroquiste grande y 40% en macroquiste pequeño. La diferencia en la

respuesta inmune puede deberse a diversos factores entre ellos al número de desafíos con el antígeno, siendo el mejor protocolo de inmunización aquel que logra la inactivación de las proteínas antigénica y presenta mayor número de inoculaciones en el tiempo establecido. El efecto térmico según otros autores es considerado uno de los métodos de elección frente al de formol debido a que el tratamiento térmico contribuye a la eliminación de posibles contaminantes y además se deja de utilizar sustancias que son dañinas para el humano (Labeque *et al.*, 2003; Marin 2004). Empero en el proyecto no se pudo corroborar. Por lo tanto en el estudio se demostró que el uso de los tres protocolos son efectivos para producir anticuerpos.

En el cuadro 3 se puede apreciar que en el caso de los macroquistes grandes de *Sarcocystis aucheniae* se obtuvo 86,6% de respuesta en comparación con los macroquistes pequeños donde se obtuvo 66,6% utilizando los tres protocolos de inmunización. Al comparar los resultados de los diferentes protocolos mediante la prueba estadística exacta de Fisher, aparentemente no existe diferencia significativa. Sin embargo, la limitante se presenta por la cantidad de conejos utilizados; sin embargo, otros estudios basados en la calidad de un protocolo emplean como mínimo tres animales (Labeque *et al.*, 2003).

Por otro lado, Labeque *et al.* (2003), mencionan que el mejor protocolo para la inactivación de antígeno es la aplicación del tratamiento térmico, demostrando que la inactivación en baño María a 100°C es un método común usado en laboratorios, aunque la limitante de este tratamiento, resultaría ser el tiempo que deberían de mantenerse las proteínas en temperaturas altas, debido a que un exceso podría provocar la desnaturalización de los componentes celulares termolábiles como las proteínas y también los termoestables LPS responsables de la respuesta inmunológica. Por lo tanto, el factor de manipulación de la temperatura en este estudio pudo influir en el resultado al presentarse respuesta inmunológica no muy eficiente, donde las muestras procesadas eran dependientes del tiempo utilizado en la inactivación térmica (Marin, 2003).

El estudio evidencia que el uso de formaldehído es un método confiable para los diferentes protocolos y que el uso del tratamiento termino logra la inactivación de las proteínas evaluadas, sin embargó se recomienda seguir probando esta posibilidad utilizando otros tiempos, debido al bajo porcentaje de respuesta obtenida.

Los antígenos de macroquistes grandes obtuvieron mayor reacción Ag-Ac y presentaron durante el procedimiento de los tres protocolos menos mortalidad determinándose que los antígenos de macroquistes grandes son más antigénicos y menos virulentos que los macroquistes pequeños.

VI CONCLUSION

- Los extractos de proteínas antigénicas provenientes de macroquistes grandes (>5mm) de *S. aucheniae* presentaron una mayor respuesta inmune que los provenientes de macroquistes pequeños (1-3mm); al usar tres protocolos de inmunización. Sin embargo, no se observó asociación entre protocolos y reacción Ag-Ac al análisis de Fisher.

VII RECOMENDACIONES

- Realizar la titulación de anticuerpos en los protocolos de inmunización que hayan logrado, respuestas antígeno anticuerpo del 100% tanto donde se utilizo macroquistes pequeños y grandes.
- La inactivación de los antígenos de *S. aucheniae* con tratamiento térmico (protocolo III), deberán ser reevaluadas usando menor tiempo de exposición al calor o menor temperatura.

VIII BIBLIOGRAFIA

1. Acha P, Szyfres B. 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 3ra ed. OPS/OMS. USA: Washington D.C.413p.
2. Agarwal PK, Srivastova A. 1983. Sarcocystis In man: A report of two cases. Histopathology. 7: 783-787
3. Alva J, Rojas M, Nuñez A. 1980. Decomisos por parásitos y su importancia económica en alpacas (*Lama pacos*). Rev Inv Pec, IVITA. 5:61-63.
4. Alva J, Bazalar H, Guerrero C, Nuñez A. 1981. Observaciones del ciclo de vida del *Sarcocystis aucheniae* de alpacas (*Lama pacos*). En: V Congreso Peruano Microbiología y Parasitología. Arequipa: Asociación peruana de Microbiología y Parasitología.
5. Arce A, Rosas A, Rodríguez L. 2007. Practica de Inmunología Gene aplicada y veterinaria. México: Manual Moderno.276p.
6. Atias N. 1995. Parasitología clínica. 3ra ed. Santiago: Mediterráneo.618p
7. Barrientos V, Chávez A, Pacheco P, Ticona D, Leyva V. 2007. Efecto del toltrazuril y combinación de sulfadoxina y la pirimetamina en el control de la sarcocystiosis canina durante el periodo patente. Rev Inv Vet, Perú 18: 69-75.
8. Barriga O. 2002. Las enfermedades parasitarias de los animales domésticos en la América latina. Santiago: Germinal. 247p.
9. Barnett D, Carter JKY, Hughes DE, Baets AL, Fayer R. 1977. Practicable diagnosis of acute bovine sarcocystiosis causally related to bovine abortion,

Annu. Proc. Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn. 20:131-132.

10. Berger RG, Mageau RP, Schawab BY, Jhonston RW. 1988. Detection of poultry and pork in coked and cane med foods by ELISA J. Assoc Off Anal Chem 71: 406-409

11. Bonilla C, Zavaleta A. 1997. Estudio biquimico del veneno de la serpiente *Bothrops hyoprurus*. Rev Med Exp. 14: 2

12. Beaver PC, Gadgil RK, Morena P. 1979. Sarcocystis in man: a review and report of five cases. Am J. Trop. Med. Hyg. 28:819-820.

13. Bengins R, Odening K, Stolte M, Quandts S, Backart I. 1998. There new Sarcocystis species, *Sarcocystis giraffae*, *S. Klaseriensis*, *S. camelopardalis* (Protozoa: Sarcocystis) from the giraffe (*Giraffae camelopardalis*) In South Africa. J. Parasitol. 84(3): 562-565.

13. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72: 248-254

15. Brumpt E. 1913. Precis de Parasitologie. 4^a ed. Paris: Masson et Cie Editeurs. 37p.

16. Cabrera M. 1996. Caracterización proteica de Sarcocystis en alpacas de la zona de Cajamarca. Libro de resúmenes: I Congreso Mundial sobre Camélidos. Cajamarca-Perú. 55p

17. Castro J. 1974. *Sarcocystis aucheniae* en llamas (*Lama glama*). Rev de Inv Pec, IVITA. 3(1):91-92.

18. Castro E, Sam R, Lopez T, Gonzáles A, Silvia M. 2004. Evaluación de la edad como factor de riesgo de seropositividad a *Sarcocystis* sp. En alpacas. Rev Inv Vet, Perú. 15: 83-86.

19. Catsimpoalas N, Kenney J, Meyer EW 1971 The effect of thermal denaturation on the antigenicity of glycinin Biochim. Biophys. Acta. 229: 451-458.
20. Carrigan MJ. 1986. An outbreak of sarcocistiosis in dairy cattle. Aust Vet J. 63: 22-24.
21. Cordero del Campillo M, Rojas F, Fernández M, Sánchez M, Rodríguez S, López I. 1999. Parasitología veterinaria. Madrid: Mc Graw-Hill. 968p
22. Cornejo R, Chavez A, Leyva V, Falcon N, Panez S, Ticona D. 2007. Viabilidad de los diferentes tamaños de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* En *canis familiaris*. Rev Inv Vet, Perú.18 : 78-83
23. Choque J, Chávez A, Pacheco A, Leyva V, Panez S, Ticona D. 2007. Frecuencia de *Sarcocystis* sp en perros pastores de asociaciones alpaqueras de Marangani Cusco. Rev Inv Vet, Perú.18 : 84-88.
24. Davis SW, Speer C, Dubey J. 1991. In vitro cultivation of *Sarcocystis neurona* from the espinal cord of a horse with equine protozoal myelitis. J. Parasitol .77(5) : 789-792.
25. Dauschies A, Mundt H, Letkova V. 2000. Toltrazuril treatment of cystoisosporosis in dogs under experimental and field conditions. Parasitol. Res 86 : 797-799.
26. De Jesús R, Quiñónez W, Callaghan J. 1999. Identificación De proteínas de la membrana de *Leishmania Mexicana* con fines diagnóstico. Rev Ecol. Lat. Am. 6:9-17.
27. Dubey JP. 1976. A review of *Sarcocystis* of domestic animals and other coccidia of cats dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 169: 1061 – 1078

28. Dubey JP. 1989. Sarcocystosis of animals and man. Boca Raton CRC Press. 215p
29. Dubey JP, Davis SW, Sperr CA, Bowman DD, De Lahunta A, Granstrom DE, Topper MJ, Hamir AN, Cummings JF, Suter MM. 1991. *Sarcocystis neurona*. (Protozoa: Apicomplexa), the etiologic agent of equine protozoal myeloencephalitis. J Parasitol. 77: 212-218.
30. Dubey JP, Lindsay DS, Saville WJA, Reed SM, Granstrom DE, Speer CA. 2001. A review of *Sarcocystis neurona* and equine protozoal myeloencephalitis (EPM). Vet Parasitol. 95: 89-113.
31. Dubey JP, Sperr CA. 1986. Sarcocystis infections in mule deer *Odocoileus hemionus* in Montana and the descriptions of three new species, Am.J. Vet. Res 47:152-153.
32. Dubey JP, Sperr CA, Fayer R. 1989. Sarcocystis of animals and man. CRC Press. Boca Raton, FL, USA. 215p.
33. Fisher S, Odening K. 1998 Characterization of bovine Sarcocystis species by analysis of their 18 S ribosomal DNA sequences. J. Parasitol, 84(1): 50-54
34. Fayer R. 2004. Sarcocystis sp. In human infections. Clinical Microbiology Review. 17(4):894-902.
35. Fayer R, Dubey JP. 1986. Bovine Sarcocystiosis, comp. Contin. Educ. Pract. Vet. 8:130-131.
36. Fayer R, Elasser T. 1991. Bovine Sarcocystiosis: How parasites negatively affect growth. Parasitol. Today, 7(9): 250-255.

37. Gasbarre LC, Suter P, Fayer R. 1984. Humoral and cellular immune responses in cattle and sheep inoculated with *Sarcosystis*. Am J Vet Res. 45: 1592-1596.
38. García M, Erosa G, Núñez G. 2000. Identificación del origen de Especie animal en carne fresca utilizando Inmunodifusión doble. Tec Pecu México 38: 231-237.
39. Gornall AG, Bardawill C, David M. 1949. Determination of Serum protein by means of biuret reagent. J. Biol. Chem. 177: 751-755.
40. Guerrero C. 1971. Enfermedades parasitarias de las alpacas. En: La alpaca, enfermedades infecciosas y parasitarias. Bol. De Divulgación IVITA UNMSM. Lima, Perú. 8: 41 42.
41. Guerrero D, Hernández J. 1967 Ciclo evolutivo del *Sarcocystis* Segundo Boletín Extraordinario IVITA Nov. Lima 70-71
42. Hamir A, Dubey J. 2001 Myocarditis and encephalitis associated with *Sarcocystis neurona* infection in raccons (*Procyon lotor*) Vet. Parasitol. 95(24): 283-293
43. Heckeroth AR, Tenter AM. 1999. Developmet and validation of species-specific nested PCRs for diagnosis of acute sarcocystiosis in sheep. Int J Parasitol. 29:1331-1349.
44. Hung. 2006. Avances de *Sarcocystis* en Camélidos Sudamericanos. Concytec, avances de proyectos de investigación. [Internet] [12 enero 2007] Disponible en: <http://tumi.lamolina.edu.pe/estrategia/descarga/archivo2.pdf>
45. Huong LAMT, Dubey J, Nikkila T, Uggla A. 1997 *Sarcocystis buffalonis* (Protoza: Sarcocystis) from the water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Vietnam, J. Parasitol. 83(3): 471-474.

46. Jensen R, Alexander AF, Dahlgren RR, Jolley WC, Flack DF. 1986. Eosinophilic myositis and muscular Sarcocystiosis in the carcasses of slaughtered cattle and lambs. *Am. J. Vet. Res.* 47:587-588.
47. Joachim A, Tenter A, Jeffries A, Johnson M. 1996. A RAPD-PCR derived marker can differentiate between pathogenic and non-pathogenic *Sarcocystis* species of sheep. *Molecular and Cellular Probes.* 10: 165-172.
48. Labeque Y, Cobas G, Morris H, Verdecía A, Camacho M. 2003. Utilización de Formaldehído y tratamiento térmico en la inactivación de cultivos de *Pseudomona aeruginosa*. *Rev cubana Biomed.* 22(4):232-236
49. La Perle K, Silveria F, Anderson D, Blomme E. 1999. Dalmieny disease in an alpaca (*Lama pacos*): sarcocystiosis, eosinophilic, myositis and abortion. *J. Comp. Pathol.* 121: 287- 293.
50. Levine N. 1986. The taxonomy of *Sarcocystis* (Protozoa: Apicomplexa) species. *Parasitology Today.* 7: 54-56
51. Leguía G. 1991. The epidemiology and economic impact of llama parasites. *Parasitology Today.* 7:54-56.
52. Leguía G, Clavo N. 1989. Sarcocystiosis o triquina. Boletín Técnico N 7- CICC UNMSM CI IVITA Agosto-Lima-Perú. p 5-19.
53. Leguía G, Arevalo F. 1990. Efecto de la cocción, refrigeración, congelación y deshidratación (charqui) sobre la viabilidad del *Sarcocystis* de alpacas. *Rev. Cienc. Vet., Lima.* 6(1): 19-28.
54. Leguía G, Casas E. 1999. Enfermedades parasitarias y atlas parasitológico de camélidos sudamericanos. Lima: La Mar. 30p.

59. Leguía G, Guerrero C, Sam R, Chavez A. 1989. Infección experimental de perros y gatos con micro y macroquistes de *Sarcocystis* de alpacas (lama pacos). Rev. Cienc. Vet. Lima. 5: 10-13.
60. Lindsay D, Dubey J, Kennedy T. 2000. Determination of the activity of ponazuril against *Sarcocystis neurona* in cell cultures. Vet. Parasitol. 92: 165-169.
61. Lindsay D, Thomas N, Rosipal A, Dubey J. 2001. Dual *Sarcocystis neurona* and *Toxoplasma gondii* infection in a Northern sea otter from Washington state, USA. Vet. Parasitol. 97(2):141-144.
62. López M, Gonzáles A. 1992. Estandarización del Sistema Inmunoenzimático de detección de Anticuerpos de alpaca (*Lama pacos*) Utilizando Proteína A Conjugada con Peroxidasa. Theorema, UNMSM, Lima.2:44-45.
63. Lunde M, Fayer R. 1977. Serologic test for antibody *Sarcocystis* in cattle. J Parasitol. 63: 222-225.
64. Mansilla A. 1993. Efecto del lisado de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* en ratones, cobayos, conejos. Tesis para optar el título de Médico Veterinario Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 50p
65. Marin M. 1993. Efecto del tratamiento térmico en la hidrofobicidad, en los grupos-SH, en la antigenicidad y en la capacidad de ligar grasa de las proteínas cárnicas. Tesis doctoral de medicina veterinaria España-Madrid: Facultad de Medicina Veterinaria, Univ. Complutense de Madrid. 205 p.
66. Melo HD, Rojas MN, Neira AE. 1992. *Sarcocystis* sp en músculo de alpaca. En el estudio microscópico electrónico de las formas celulares en los macroquistes. Teorema UNMSM 2: 27.

67. Melo H. 2003. Aplicación de microscopia en el estudio de la biología celular de *Sarcocystis* sp en el músculo estriado de la alpaca. Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. 70 p.
68. Mehlhorn. 1993. Parasitología veterinaria. Bogota: Grosslatros. 195p.
69. Mertens CM, Tenter A, Vietmeyer C, Ellis JT, Jonson AM. 1996. Production of a recombinant fusion protein of *Sarcocystis tenella* and evaluation of its diagnostic potential in an ELISA. Vet Parasitol. 65: 187-197.
70. MINISTERIO DE AGRICULTURA DEL PERU. 2004. Sector pecuario en el Peru[Internet][16febrero2005].Disponible en: <http://www.minag.gob.pe/pecuario.shtml>.
71. Moro M. 1987. Sarcocystiosis: enfermedades infecciosas parasitarias de las alpacas. Revista de Camélidos Sudamericanos, Lima. 4: 38-43.
72. Mostajo W. 1983. Sarcocistiosis en alpacas beneficiadas en el camal municipal de Santa Rosa. Tesis de Medico Veterinario Zootecnista. Puno: Univ. Nac. Del Altiplano. 68p.
73. Nakamura T, Saito M, Shibata Y, Itagaki H. 1999. Induction of tumor necrosis factor and nitric oxide in rabbits inoculated with a cyst extract of *Sarcocystis cruzi*. Vet. Parasitol. 38 (4):236-243.
74. Odening K, Stolte M, Backhardt I. 1996. On the diagnostics of *Sarcocystis* of a species unusual for bous Taurus in a dwat Zebu. Vet. Parasitol. 66(1): 19-24.
75. Orlando H, Kuby J. 2003. Inmunológica, Diagnostico e interpretación de pruebas de laboratorio. Immunology, 5 ed. New York: WH Freeman and

Company, cop. 18p.

76. Quiroz H. 2000. Parasitología y Enfermedades Parasitarias de animales domesticos. México: Limusa. 876p.

77. Quiroga D, Lombardero O, Zorrilla R. 1969. *Sarcocystis tilopi* n. sp. en guanacos (*Lama guanicoe*) de la República de Argentina. Gaceta Veterinaria. 31:67-70.

78. Quispe A. 2004. Efectividad de la Primaquina, Sulfaquinoxalina y Primaquina-Sulfaquinoxalina en el tratamiento de la sarcocistiosis en perros infectados experimentalmente con quistes microscópicos y macroscópicos. Tesis de Medico Veterinario y Zootecnista. Puno: Univ. Nac. Del Altiplano. 47p.

79. Radostis O, Gay C, Blodd D, Keneth W, Cliff H. 2002. Medicina veterinaria: Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino, equino. Madrid: Mc Graw – Hill. España. 2215p

80. Rojas M. 1990, Parasitismo de los rumiantes domésticos: terapia, prevención y modelos para su aprendizaje. Lima: Mijosa. 383p

81. Ramírez A, Franco E, Pezo D, García W. 1998. Diagnostico y control de las enfermedades en camélidos sudamericanos. Publ. Téc. Fac. Med. Vet. Lima. 34: 70-74.

82. Ramírez A, Sam R, Ameghino E, Pezo D. 1995. Método de ELISA para la detección de anticuerpos contra *Sarcosystis aucheniae*. Teorema. 6: 64-65.

83. Sam R. 1988. *Sarcocystis aucheniae*: caracterización parcial de componentes antigénicos y patología clínica experimental en alpacas. Tesis de doctorado en ciencias biológicas Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos.

118 p.

84. Sam R, Mansilla I, Morales C, Ramírez A. 1998. Efecto tóxico de macroquistes de *Sarcocystis aucheniae* en ratones, coballos y conejos. Rev. Inv. Pec, IVITA. 9(2):11-18.
85. Sam R, Verastegui M, Mallqui V, Ramírez A. 1996. Detección de anticuerpos contra *Sarcocystis aucheniae* en alpacas mediante electroinmunotransferencia. Cajamarca: I Congreso Mundial sobre Camélidos.
86. Sam R, Gonzáles A, López T, Verastegui P. 1999. Desarrollo de un método de electroinmunotransferencia para la detección de anticuerpos anti *Sarcocystis aucheniae* en alpacas. Rev Inv Vet, Perú. 10: 82-85.
87. Saravia Z. 2003. Anticoccidiales en el tratamiento de la sarcocistiosis en perros infectados con microquistes de alpacas. Tesis de Medico Veterinario y Zootecnista. Puno: Univ. Nac. Del altiplano. 49p.
88. Savini G, Dunsmore JD, Robertson ID. 1994. Evaluation of a serological test system for the diagnosis of *Sarcocystis cruzi* infection in cattle using *S. cruzi* merozoite antigen. Vet Parasitol. 51:191-189.
89. Savini G, Robertson ID, Dunsmore JD. 1997. Class-specific antibody responses in cattle following experimental challenge with sporocystis or merozoites of *Sarcocystis cruzi*. Vet Parasitol. 72: 121-127.
90. Shi LZ, Zhao HY. 1987. Evaluation of an enzyme immunoassay for the detection of antibodies against *Sarcocystis* sp. In naturally infected cattle in china. Vet Parasitol. 24: 185-194.
91. Soulsby EJ. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7 ed. México: Interamericana. 823p.

92. Sobel RA, Colvin RB. 1986. Responder strain-specific enhancement of endothelial and mononuclear cell Ia in delayed hypersensitivity reactions in (strain2xstrain13) F₁ guinea pigs, J. Immunol. 159: 136-157.
93. Tanhauser S, Cheadle M, Massey E, Mayer B, Schroedter J, Dome E, Greiner, Mackay R. 2001. The nine-banded armadillo (*Dasipus novemcinctus*) is naturally infected with *Sarcosystis neurona*. International Journal for Parasitology. 31(4): 325-239.
94. Tello R. 2000. Coccidiosis. Rev Diagnostico De La Univ. Cayetano Heredia Perú. 39:116-119.
95. Tenter AM. 1988. Comparison of Dot-ELISA and IFAT for the detection of IgG antibodies to *Sarcocystis muris* in experimentally infected and immunized mice. Vet Parasitol. 29:89-104.
96. Tenter A, Luton K, Johnson A. 1994. Appl Parasitol. 35: 173-188.
97. Tenter AM. 1995. Current research on *Sarcocystis* species of domestic animals. Int. J. Parasitol. 25: 1311-1330.
98. Torres J, Bover M, García J. 1981. Avance en el estudio del ciclo biológico del *Sarcocystis aucheniae*. Avance Veterinario UNICA, Chíncha. 1(1):37-40.
99. Ugglá A, Buxton D. 1990. Immune responses against *Toxoplasma* and *Sarcocystis* infection in ruminants: diagnosis and prospect for vaccination. Rev. Sci. Tech. Jun 9 (2): 441-619.
100. Uzuriaga M, Sam R, Manchego A, Alvarado A. 2008. Desarrollo de estadios asexuales de *sarcocystis aucheniae* en cultivo de células. Rev Inv Vet, Perú. 19(1): 49-53

101. Urquhart G, Armour J, Duncan J, Jenmings F. 2001. Parasitología Veterinaria. 2 ed. Zaragoza: Acribia. 355p
102. Valderrama PA. 1999. Relación de la sarcocystiosis macroscópica en carne de alpaca con la presencia de lesiones bucales. Puno-Perú. 45p.
103. Vilca J, Vilca F, Chavez A, Urviola M, Leyva V. 2007. Efecto del toltrazuril al 2,5% durante el periodo prepotente de la Sarcocystiosis intestinal canina. Rev Inv Vet, Perú. 18: 64-68.
104. Vilca M. 1991. Producción, tecnología e higiene de la carne. En: Avances y perspectivas del conocimiento de los camélidos sudamericanos. Santiago: FAO. 429p.
105. Volf J, Modry D, Kaudela B, Slapeta J. 1998. Discovery of the life cycle of *Sarcocystis lacérate* Babudieri, 1932 (Apicomplexa: Sarcocystidae). The Journal of Eukaryotic Microbiology. 45:18-21.
106. Von Brand Theodor. 1979. Biochemistry and Physiology of Endoparasites. Elsevier North Holland Biochemical Press. 447p
107. Weyreter H, Donoghue PJ, Weber M, Rommel M. 1984. Class specific antibody responses in pigs following immunization and challenge with sporocysts of *Sarcocystis miesheriana*. Vet. Parasitol. 16(3):201-205.
108. White S. 1998. Sarcocystis: A parasite Endemic to Andean Alpacas. Vol III. N°1. The Alpaca registry Journal [Internet], [12setiembre 2009]. Disponible en: <http://www.alpacaregistry.net/journal/win98j-12.html>

ANEXO I

Mortalidad observada en conejos durante el protocolo de inoculación I

| Días de inmunización | Procedimiento | CONEJOS | | | | | |
|-------------------------|---|---|--|---|---|--|--|
| | | MP | MP | MP | MP | MG | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 1 | Inoculación Fracción de Ag+AFC+formol 10% VIA IM | | | | | | |
| 4 | Sangría | | | | | | |
| 5 | Inoculación Fracción de Ag+AFI+formol 10%. VIA SC | | | | | | |
| 8 | Sangría | | | | | | |
| 9 | Inoculación Fracción de Ag+AFC +formol 10%. VIA IM | | | | | | |
| 12 | Sangría | | | | | | |
| 13 | Inoculación Fracción de Ag+AFC +NaCl 0.85% VIA IM | animal murió 8 horas después de inocular | animal murió 12 horas después de inocular | animal murió 9 horas después de inocular | animal murió 12 horas después de inocula r | animal murió 22 horas después de inocular | animal murió 24 horas después de inocular |

* AFC Adyuvante Freund Completo

* AFI Adyuvante Freund Incompleto

* MG Macroquistes grandes

* MP Macroquistes pequeños

Nota: Todos los animales que murieron fueron reemplazados por otros para completar el tamaño experimental requerido.